

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Vegetal



**Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos:  
Concentração e (Bio)disponibilidade**

Cheila Neves Mandim da Torre

Dissertação  
Mestrado em Ciências do Mar

**2014**



Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Vegetal



**Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos:  
Concentração e (Bio)disponibilidade**

Cheila Neves Mandim da Torre

Dissertação  
Mestrado em Ciências do Mar

Orientadores:  
Professora Doutora Isabel Caçador e Mestre Carlos Borges

**2014**



## Agradecimentos

O estágio que culmina na elaboração desta Tese de Mestrado simbolizou uma longa viagem repleta de desafios, dificuldades, surpresas, decepções, alegrias e sobretudo vitórias. Percorrer cada milha só foi possível graças à energia, perseverança, motivação, força e alegria que reflectiram o apoio dado por inúmeras pessoas. Na impossibilidade de falar de todas elas que de alguma forma me apoiaram, às quais expresso a minha profunda gratidão, realço as que merecem uma maior distinção:

Ao Instituto Hidrográfico, designadamente aos Directores-Gerais e Directores Técnicos que apoiaram e autorizaram o desenvolvimento da investigação associada a este trabalho.

Ao Centro de Oceanografia, pelos meios disponibilizados na concretização de toda a parte referente à biodisponibilidade.

À minha orientadora Professora Doutora Isabel Caçador, pela elevada competência e confiança depositada e pelo constante apoio e encorajamento. Foi e continua a ser um modelo a seguir e foi fundamental para tornar este mestrado numa agradável experiência de aprendizagem. Sou grata pelas suas palavras de incentivo em diversos períodos: antes e durante este estágio.

Ao orientador interno, Mestre Carlos Borges e à Mestre Catarina Rocha, pela orientação e ensinamentos dados durante o decorrer do estágio.

À Ten. Isabel Cruz e Doutora Carla Palma pelo apoio demonstrado durante todo o estágio, revisões do poster e da tese, respectivamente, e por me terem integrado com profissionalismo, simpatia e amabilidade na Divisão de Química e Poluição do Meio Marinho.

Aos colegas, mas sobretudo amigos de trabalho mais próximos, Maria João Freire, Filipa Martins, Rute Martins, João Reis, Geraldês Rodrigues e Luís Pedroso, um agradecimento especial pela vossa paciência, palavras de incentivo e principalmente apoio dedicado ao longo deste último ano.

Às “minhas” forças motrizes, Dra. Maria João Champalimaud de Mello pelo apoio especial dado durante cada segundo deste estágio e à Eng. Manuela Valença que foi incansável na elaboração do poster e da tese e por todas as suas palavras de incentivo.

À Eng. Judite Matos pelo apoio no laboratório nos momentos mais críticos, à sua constante preocupação comigo, ao seu bom humor e palavras de apoio.

À Eng. Paula Santos pelo apoio no laboratório e palavras elucidativas.

Aos restantes elementos da Divisão de Química e Poluição do Meio Marinho.

Ao estudante de Doutoramento Bernardo Duarte pela ajuda no planeamento e concretização de toda a parte do trabalho referente à biodisponibilidade.

A ti Bruno, por todo o amor, apoio e tolerância que me levaram a superar todas as barreiras ao longo deste mestrado.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, força e motivação revelada em cada palavra e acção e sem os quais jamais chegaria até aqui.

## Resumo

A monitorização do ambiente marinho nas últimas décadas tem sido efectuada com grande ênfase na avaliação de contaminantes químicos em diversas matrizes (água, sedimento e biota). Nestas, têm sido rotineiramente monitorizados os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, PAHs (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) e os seus derivados alquilados.

Com este trabalho optimizou-se a detecção e quantificação dos PAHs e dos seus derivados alquilados, através da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Detecção por Espectrometria de Massa (GC-MSD), e foram comparados os valores da concentração com a sua (bio)disponibilidade na planta *Spartina maritima*.

A grande maioria dos sedimentos recolhidos no Estuário do rio Tejo e a totalidade dos sedimentos recolhidos na Ria Formosa pertencem, de acordo com a Portaria 1450/2007 às classes 1 – material dragado limpo e 2 – material dragado com contaminação vestigiária. As únicas estações em que o sedimento recolhido estava ligeiramente contaminado (classe 3) foram registadas no Estuário do rio Tejo para a estação 4 (baía do Seixal) e 17 (esteiro de Coinal).

Os resultados obtidos para os diversos somatórios de PAHs demonstraram que o Estuário do rio Tejo apresenta uma maior influência antropogénica que a Ria Formosa.

A planta *Spartina maritima* teve a capacidade de assimilar os compostos a que esteve exposta (16 PAHs da US EPA), com uma maior acumulação ao nível da raiz, sobretudo para os PAHs com potencial carcinogénico.

Nas raízes, o somatório dos PAHs carcinogénicos aumentou proporcionalmente à concentração na solução em que estavam expostas. Estes resultados parecem fortalecer a hipótese da acumulação dos compostos mais perigosos para o ecossistema na raiz desta planta. Foi ainda verificado que existe um ponto de saturação a nível da raiz, a partir do qual essa acumulação passa a ocorrer na parte aérea.

No âmbito deste trabalho foi apresentado um poster nas 3<sup>as</sup> Jornadas de Engenharia Hidrográfica do Instituto Hidrográfico (Anexo B).

**Palavras-Chave:** hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, derivados alquilados, Cromatografia Gasosa acoplada à Detecção por Espectrometria de Massa, (bio)disponibilidade, *Spartina maritima*.

## Abstract

The surveillance of marine environment in the last decades has been carried out with great emphasis on the evaluation chemical contaminants in different matrices (water, sediment and biota). In these, the polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) and their alkylated derivatives have been routinely monitored.

This work allowed the development of detection and quantification of PAHs and their alkylated derivatives using the technique of Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry Detection (GC-MSD) and the concentration results have been compared with their (bio)availability in *Spartina maritima* plant.

The majority of the sediments collected on Tagus's River Estuary and all the sediments collected in Ria Formosa belongs, under the ordinance 1450/2007, to class 1 (clean dredged material) and class 2 (trace contamination on dredged material). The only stations where the sediment was slightly contaminated (class 3) were detected in Tagus's River Estuary on station 4 (Seixal bay) and 17 (esteiro de Coina).

The results obtained for the sum of PAHs showed that Tagus's River Estuary presents a higher anthropogenic influence than Ria Formosa.

The *Spartina maritima* plant showed the capacity to assimilate the compounds to which has been exposed (16 PAHs of US EPA) with a higher accumulation at the root, especially for the PAHs with carcinogenic potential.

In the roots, the  $\Sigma$ CPAHs sum increased proportionally to the concentration in the solution to which they were exposed. These results seem to strengthen the hypothesis of accumulation of the most dangerous compounds to ecosystems at this plant's root. It was also found that there is a saturation point at the roots, from where the accumulation starts to occur in the shoot.

As a result of this work, it was presented a poster on the 3<sup>rd</sup>s Journeys of Hydrographic Engineering on Instituto Hidrográfico (Annex B).

**Keywords:** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, alkylated derivatives, Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry Detection, (bio)availability, *Spartina maritima*.

## Siglas e Definições

ASE:	<i>Accelerated Solvent Extraction</i> (Extracção Acelerada por Solventes)
CA:	Critério de Aceitação
DBT:	Dibenzotiofeno
DCM:	Diclorometano
DE:	<i>Diatomaceous Earth</i> (Terra de Diatomáceas)
BeP:	Benzo(e)pireno
GC-MSD:	<i>Gas Chromatography-Mass Selective Detection</i> (Cromatografia Gasosa acoplada à Detecção por Espectrometria de Massa)
LD:	Limite de Detecção
LQ:	Limite de Quantificação
NQA:	Normas de Qualidade Ambiental
PAHs:	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos ( <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i> )
Per:	Perileno
Pis:	Padrões Internos
PLE:	Extracção Líquida Pressurizada ( <i>Pressurized Liquid Extraction</i> )
PS:	Peso Seco
QUASIMEME:	<i>Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe</i>
R ou Rec:	Recuperação
US EPA:	United States Environmental Protection Agency (Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos)
1-MN:	1-metilnaftaleno
2,3,5-MN:	2,3,5-trimetilnaftaleno
2-MPhe:	2-metilfenantreno
3,6-MPhe:	3,6-Dimetilfenantreno
N:	Naftaleno
Acy:	Acenaftileno
Ace:	Acenafteno
F:	Fluoreno
Phe:	Fenantreno
A:	Antraceno
Fluo:	Fluoranteno
P:	Pireno
BaA:	Benzo(a)antraceno
Chr+Tph:	Criseno+Trifenileno
B(b)F:	Benzo(b)fluoranteno
B(k)F:	Benzo(k)fluoranteno
BaP:	Benzo(a)pireno
Ind:	Indeno(1,2,3-cd)pireno
DBA:	Dibenzo(a,h)antraceno
B(ghi)P:	Benzo(g,h,i)perileno



# Índice

<b>Capítulo I: Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Poluentes e os seus efeitos	2
1.2 Hidrocarbonetos	2
1.2.1 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos	3
1.3 (Bio)disponibilidade	8
1.4 Os Estuários e a sua Importância	9
1.5 Descrição das áreas de Estudo	13
1.5.1 Estuário do rio Tejo	13
1.5.2 Ria Formosa	16
<b>Capítulo II: Metodologia de Análise</b>	<b>17</b>
2.1 Amostragem de Sedimento	17
2.2 Metodologias Analíticas	22
2.2.1 Tratamento das Amostras de Sedimento	22
2.2.1.1 Peneiração das Amostras de Sedimento	23
2.2.1.2 Liofilização das Amostras de Sedimento	24
2.3 Amostragem de <i>Spartina maritima</i>	24
2.3.1 Experiências de <i>Spartina maritima</i>	24
2.4 Moagem/Laminação das Amostras	26
2.4.1 Conservação e Armazenamento	26
2.5 Determinação do Peso Seco	27
2.6 Determinação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos	28
2.6.1 Reagentes e Padrões	28
2.7 Extracção	29
2.7.1 Extracção Acelerada por Solvente	29
2.7.2 Extracção por Soxhlet	31
2.7.3 Remoção de Enxofre/Concentração e Purificação dos Extractos	33
2.8 Preparação de Extractos e Padrões para Análise Cromatográfica	34
2.9 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa	36
2.9.1 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa	36
2.10 Limites Analíticos – Limite de Detecção e de Quantificação	38
2.11 Controlo de Qualidade	40
2.12 Quantificação das Amostras	44
<b>Capítulo III: Tratamento e Análise dos Resultados</b>	<b>47</b>
3.1 Análise Estatística	47
3.2 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em Sedimentos	47
3.2.1 Somatório dos 16 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos da US EPA	47
3.2.2 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos com Potencial Carcinogénico	50
3.2.3 Análise dos compostos individuais dos Sedimentos	52
3.2.3.1 Análise dos 16 compostos da US EPA	52
3.2.3.2 Análise dos Compostos Adicionais	54
3.2.3.3 Análise dos Grupos Homólogos Alquilados do Naftaleno e do Fenantreno	56
3.2.3.4 Sumário da Análise dos compostos no sedimento	58
3.3 Toxicidade em Sedimentos	59
3.3.1 Comparação com os Critérios de Avaliação de Background	60
3.3.2 Factores Equivalentes de Benzo(a)pireno para o sedimento	62
3.3.3 Quocientes Médios de Risco para o Sedimento	64
3.3.4 Guias de Qualidade para o Sedimento	66
3.4 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em <i>Spartina maritima</i> (16 PAHs da US EPA)	70
<b>Capítulo IV: Conclusões e Trabalho Futuro</b>	<b>75</b>
Bibliografia	79
APÊNDICES	87
ANEXOS	99

# Índice de Figuras

Fig. 1 - 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA. ....	5
Fig. 2 - Estações de amostragem para o sedimento, com base nas coordenadas geográficas descritas na tabela III. ....	17
Fig. 3 - Estações de amostragem de sedimento do Estuário do rio Tejo (1 a 18). ....	20
Fig. 4 - Estações de amostragem de sedimento na Ria Formosa (19 a 22). ....	21
Fig. 5 - Navio Fisália e semi-rígida. ....	21
Fig. 6 - Draga (a) <i>Smith-McIntyre</i> e (b) <i>petit ponar</i> . ....	22
Fig. 7 - Fluxograma relativo à pré-preparação das amostras de sedimento. ....	23
Fig. 8 - Amostra controlo, P3, P5 e P6 de <i>Spartina maritima</i> . ....	25
Fig. 9 - Estufa com as amostras de <i>Spartina maritima</i> . ....	25
Fig. 10 - Processo de lavagem da <i>Spartina maritima</i> . ....	26
Fig. 11 - Extração em <i>Soxhlet</i> utilizada nas amostras de <i>Spartina maritima</i> . ....	32
Fig. 12 - Variação entre os duplicados, em percentagem, para todos os compostos. Critério de Aceitação ( $CA \leq 20\%$ ). ....	42
Fig. 13 - Z-score obtidos pelo IH para PAHs a partir de 2012 para o P, Chr+Tph, BeP e Dbt. ....	44
Fig. 14 - Distribuição espacial do somatório dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA. ....	49
Fig. 15 - Distribuição espacial do somatório dos PAHs com potencial carcinogénico para as amostras de sedimento. ....	51
Fig. 16 - Concentração dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA para as amostras de sedimento. ....	53
Fig. 17 - Concentração em sedimento dos 7 PAHs designados de adicionais. ....	55
Fig. 18 - Concentração em sedimento dos PAHs homólogos alquilados do naftaleno e do fenantreno. ....	57
Fig. 19 - Distribuição espacial dos factores equivalentes de benzo(a)pireno (EBaP) em sedimentos. ....	63
Fig. 20 - Distribuição espacial dos Quocientes Médios de Risco do somário dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA. ....	65
Fig. 21 - Avaliação da contaminação combinada em sedimentos através dos coeficientes médios de ERM para os PAHs. ....	69
Fig. 22 - Concentração dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA para as amostras de <i>Spartina maritima</i> . ....	70
Fig. 23 - Concentração dos 16 PAHs da US EPA para as amostras de <i>Spartina maritima</i> para a raiz e parte aérea. ....	71
Fig. 24 - Concentração dos PAHs com potencial carcinogénico para as amostras de <i>Spartina maritima</i> na raiz e parte aérea. ....	72

# Índice de Tabelas

<b>Tabela I</b> - Propriedades físico-químicas e distribuição de anéis dos 16 PAHs da US EPA .....	6
<b>Tabela II</b> - Classificação granulométrica dos sedimentos (Escala Granulométrica de acordo com Wentworth (1922)).....	12
<b>Tabela III</b> - Registo das estações de amostragem, localização e respectivas coordenadas geográficas .....	18
<b>Tabela IV</b> - Plano de amostragem relativo às colheitas efectuadas .....	19
<b>Tabela V</b> - Registo das características de cada um dos solventes utilizados na actividade laboratorial.....	28
<b>Tabela VI</b> - Características de cada um dos reagentes sólidos utilizados na actividade laboratorial.....	28
<b>Tabela VII</b> - Características dos padrões utilizados para a análise por GC-MSD .....	29
<b>Tabela VIII</b> - Condições operacionais para a extracção de PAHs em amostras de sedimento .....	31
<b>Tabela IX</b> - Condições operacionais para a extracção de PAHs em amostras de <i>Spartina maritima</i> .....	32
<b>Tabela X</b> - Características do padrão mãe de Metilnaftalenos .....	35
<b>Tabela XI</b> - Características dos padrões de trabalho utilizados para a análise por GC-MSD .....	35
<b>Tabela XII</b> - Características dos padrões de calibração e de validação/verificação da calibração.....	36
<b>Tabela XIII</b> - Condições instrumentais do GC-MSD na caracterização das amostras (sedimento e <i>Spartina maritima</i> ) .....	37
<b>Tabela XIV</b> - Registo dos iões de quantificação e confirmação dos PAHs em estudo .....	38
<b>Tabela XV</b> - Valor médio, mínimo e máximo das recuperações para os diversos compostos analisados .....	40
<b>Tabela XVI</b> - Equações das rectas e os seus coeficientes de correlação.....	41
<b>Tabela XVII</b> - Comparação dos teores dos PAHs analisados com os Critérios de Avaliação de <i>Background</i> .....	61
<b>Tabela XVIII</b> - Prioridade de acção associada a uma probabilidade de toxicidade (Long & MacDonald, 1998) .....	67
<b>Tabela XIX</b> - Número de SQG excedidos em cada estação de amostragem .....	68
<b>Tabela XX</b> - Concentração dos PAHs de LMW e HMW na raiz e parte aérea .....	73

# Objectivos

## Objectivos Gerais:

Determinação dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs) considerados prioritários pela Agência Norte-Americana de Protecção Ambiental (US EPA - *Environmental Protection Agency*) assim como de 7 PAHs adicionais e de alguns grupos de homólogos alquilados através da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Detecção por Espectrometria de Massa (GC-MSD).

## Objectivos Específicos:

Determinar em 30 amostras de sedimento, a concentração destes PAHs e comparar com a sua (bio)disponibilidade em *Spartina maritima* sujeita a concentrações de PAHs semelhantes às determinadas nos sedimentos.

Desta forma, pretende-se contribuir para uma monitorização cada vez mais fidedigna relativamente aos parâmetros físico-químicos analisados. Este facto permitirá potenciar resultados obtidos por parte de projectos envolvidos na monitorização e conservação do ambiente marinho, com implicações directas na saúde humana.

## Capítulo I: Introdução

A superfície terrestre encontra-se maioritariamente coberta por água, cerca de 70%. Desses 70%, o mar representa quase a totalidade, cerca de 97% (Talley *et al.*, 2011). Desta forma, o mar representa de forma inquestionável uma parte fundamental da biosfera, também considerado fonte importante de recursos energéticos, alimentares e minerais, sendo muitos destes renováveis.

O meio ambiente marinho, caracterizado pelos oceanos, mares e os complexos das zonas costeiras, forma um conjunto integrado que é uma componente essencial do sistema que permite a existência de vida sobre a Terra.

Os oceanos têm uma grande capacidade de autodepuração como a diluição, dispersão, sedimentação de partículas sólidas, vaporização, destruição de matéria orgânica por oxidação e capacidade depuradora das algas e dos microorganismos (Gadd, 1990). No entanto, não devemos esquecer que a introdução de substâncias poluidoras no meio marinho tem um impacto ecológico muito importante, podendo afectar o equilíbrio dos ecossistemas oceânicos. Essas substâncias podem acumular-se em espécies marinhas, perturbando toda a cadeia alimentar chegando, em certos casos, a atingir níveis de toxicidade perigosos para a saúde pública.

Na área ambiental, ao longo das últimas décadas, tem existido uma crescente preocupação por parte da comunidade científica em garantir o equilíbrio entre o desenvolvimento económico das nossas sociedades e a preservação dos ecossistemas. Existiram décadas em que a prioridade foi dada exclusivamente ao desenvolvimento económico, sendo completamente negligenciada a preservação do ambiente, no entanto tem sido efectuado um grande progresso nesse sentido e actualmente já se verifica a existência de um compromisso entre ambos.

Actualmente, as alterações nas zonas costeiras devido às actividades humanas, assim como os processos biogeoquímicos são alvo de estudo e monitorização continuados, sobretudo com o intuito de conseguir explicar todo o processo e capacidade destes sistemas para adsorverem os contaminantes de origem terrestre e mesmo atmosférica, o seu tempo de residência e a sua acumulação nos estuários e ambiente costeiro (Martin & Milliman, 1997).

## 1.1 Poluentes e os seus efeitos

Os poluentes são compostos que provocam efeitos nocivos em qualquer ecossistema. No caso específico do ecossistema marinho, quando estes compostos chegam à coluna de água sofrem diversos processos físico-químicos como evaporação, oxidação, dispersão, emulsão, dissolução, biodegradação, entre outros, sendo a etapa final, na maioria dos casos, a sua sedimentação (Gadd, 1990). Deste modo, os sedimentos podem conter elevadas cargas de metais pesados e compostos orgânicos, nomeadamente os hidrocarbonetos e compostos organoclorados provenientes da acção antropogénica. No entanto, os seus efeitos adversos podem resultar da sua presença mas, sobretudo da sua persistência no ecossistema. Praticamente, todas as substâncias em concentrações elevadas têm um efeito tóxico para o ecossistema envolvente, contudo, a sua persistência concede-lhes um efeito tóxico ainda mais elevado. O facto de serem poluentes quimicamente estáveis que não são totalmente biodegradáveis confere-lhes um potencial de risco mesmo após a cessação da(s) sua(s) emissões, como acontece com alguns hidrocarbonetos.

## 1.2 Hidrocarbonetos

Os estudos para avaliar o comportamento de um derrame de petróleo ou de uma descarga rotineira de um efluente nos locais receptores exigem a caracterização de hidrocarbonetos em amostras ambientais e a sua correlação com as diversas fontes de hidrocarbonetos conhecidas. No entanto, os precursores biológicos de hidrocarbonetos derivados do ambiente terrestre e aquático compreendem plantas vasculares, animais, bactérias, algas (Readman *et al.*, 2002; Meyers, 2003), ocorrendo também a produção de algumas destas estruturas, tais como fitanos, hopanos e esteranos, por meio de degradação química e bacteriana a partir de lípidos presentes naturalmente no ambiente (Readman *et al.*, 2002; Medeiros *et al.*, 2005). As origens antropogénicas de hidrocarbonetos estão em geral associadas a fontes petrogénicas, sendo a presença destes compostos no meio aquático verificada como resultado da disposição inadequada de esgotos domésticos e industriais, drenagem de rios, actividades marítimas e tráfego de barcos, produção e transporte de petróleo, queima de combustíveis fósseis por veículos, processos industriais e queima de resíduos (Daskalou *et al.*, 2009).

Os hidrocarbonetos são constituintes importantes do material orgânico terrestre que entra nas massas de água. O estudo destes compostos em ambientes aquáticos baseia-se geralmente nas análises na coluna de água, organismos e sedimentos; no entanto, os hidrocarbonetos presentes nos sedimentos aquáticos têm sido foco de muitas pesquisas devido à facilidade destes compostos se unirem ao material particulado e alcançarem o fundo dos corpos hídricos (Medeiros *et al.*, 2005).

De acordo com Daskalou *et al.* (2009) os hidrocarbonetos introduzidos em sedimentos de lagos tendem a apresentar um elevado tempo de residência devido a factores como (a) elevado peso molecular, baixa solubilidade e pressão de vapor, que facilitam a associação destes compostos com as partículas do sedimento e (b) a pequena susceptibilidade a degradação relativamente à maioria das formas de matéria orgânica, devido à falta de grupos funcionais que promovam uma maior capacidade de reactividade química.

Segundo Readman *et al.* (2002) sedimentos anóxicos com predominância de silte actuam como importantes depósitos de hidrocarbonetos, os quais podem permanecer inalterados durante anos.

### **1.2.1 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos**

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) constituem uma extensa série de compostos de ocorrência ubíqua (Neff, 1979), isto é, estão presentes em todos os ambientes terrestres e marinhos, constituindo uma classe importante de compostos orgânicos extensamente investigados na literatura científica, não apenas devido à sua abundância mas, também devido ao seu potencial efeito tóxico nos organismos dos ecossistemas naturais. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos têm recebido uma atenção considerável devido ao seu potencial carcinogénico documentado em experiências com animais (Manoli & Samara, 1999), sendo frequentemente associados a um aumento de incidência de vários tipos de cancro (WHO, 2004; AWWA, 1999).

Devido às suas propriedades físico-químicas e à sua ubiquidade, o risco para a saúde humana resultante da exposição aos PAHs é significativo. De facto, e associado ao seu carácter lipofílico, os PAHs podem ser absorvidos pela pele, por ingestão ou inalação, sendo distribuídos rapidamente pelo organismo (WHO, 2004).

Os PAHs são uma família de moléculas constituídas unicamente de carbono (C) e hidrogénio (H), com uma estrutura aromática de dois ou mais anéis condensados e podem apresentar ramificações constituídas de cadeias alifáticas (substituintes alquil), sendo denominados de PAHs alquilados. O naftaleno ( $C_{10}H_8$ ) possui apenas dois anéis benzénicos, sendo o composto com a estrutura química mais simples dos PAHs.

A monitorização destes compostos em amostras ambientais é um passo importante para o controlo da exposição. Com base na sua frequência de ocorrência no ambiente e o seu potencial mutagénico e carcinogénico já evidenciados, a convenção de protecção do meio marinho OSPAR (Oslo & Paris Commission) de 2009 refere estes compostos como compostos prioritários para monitorização ambiental. Para além disso, foram ainda definidos 16 PAHs como prioritários de acordo com a agência de protecção ambiental americana (US EPA - *United States Environmental Protection Agency*) (Santos & Galceran, 2002). O Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto definiu o valor paramétrico permitido de  $0,010 \mu\text{g L}^{-1}$  para o benzo(a)pireno para a água destinada ao consumo humano. Na figura 1 está ilustrada a estrutura de cada um dos 16 PAHs seleccionados pela US EPA e estudados neste trabalho e na tabela I encontram-se registadas as propriedades físico-químicas desses compostos.

A nível nacional, de acordo com o Decreto-Lei n.º 103/2010 de 24 de Dezembro, para o grupo de substâncias prioritárias PAHs só são estabelecidas normas de qualidade ambiental (NQA), ou seja valores limite para o benzo(a)pireno, soma do benzo(b)fluoranteno e do benzo(k)fluoranteno e para a soma do benzo(g,h,i)perileno e do indeno(1,2,3-cd)pireno para águas superficiais. Relativamente à Lei n.º 58/2005 de 29 de Dezembro (Lei da Água, que transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 2000/60/CE, de 23 de Outubro, do Parlamento Europeu) que estabelece as bases e o quadro institucional para a gestão sustentável das águas, não especifica os PAHs a quantificar.



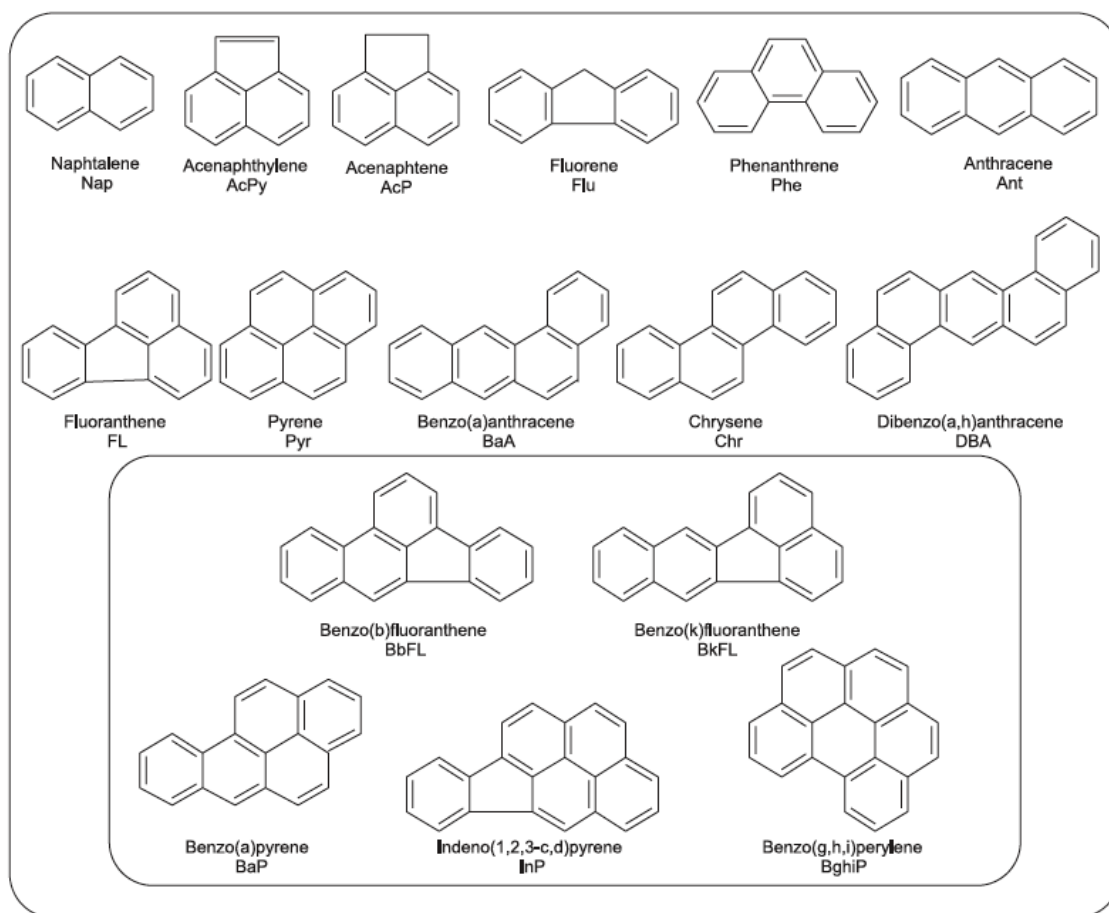


Fig. 1 - 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA. Os cinco compostos dentro da caixa pequena são os compostos considerados pela *European Council Directive 98/83/EC*. Debaixo de cada estrutura química está o nome e o acrónimo de cada hidrocarboneto. Adaptado de Coelho *et al.* (2008).

**Tabela I** - Propriedades físico-químicas e distribuição de anéis dos 16 PAHs da US EPA de acordo com (1) Mackay *et al.*, 1992; (2) Louro, 1997 e (3) Mazeas, 2004.

PAHs	Nº de anéis (1)	MM <sup>a</sup> (g mol <sup>-1</sup> ) (1)	PF <sup>b</sup> (°C) (2)	PE <sup>c</sup> (°C) (2)	Solubilidade em água <sup>d</sup> (mg L <sup>-1</sup> ) a 25°C (3)	Log K <sub>ow</sub> <sup>e</sup> (3)	Log K <sub>oc</sub> <sup>f</sup> (3)	Log K <sub>d</sub> <sup>g</sup> (3)	Pressão de vapor <sup>h</sup> (Pa a 25°C) (3)	Constante de Henry <sup>i</sup> Atm.m <sup>3</sup> /mol 10 <sup>-6</sup> ar/água (3)
1. Naftaleno	2	128	80	218	31,8	3,4	3,0	1,7	10,5	483
2. Acenaftileno	3	152	92	265	16,1	4,1	-	-	-	-
3. Acenafteno	3	154	96	279	3,7	3,9	3,7	-	0,36	145
4. Fluoreno	3	166	116	293	1,98	4,2	3,9	-	9x10 <sup>-2</sup>	91
5. Fenantreno	3	178	101	340	1,2	4,6	4,2	2,7	1,8x10 <sup>-2</sup>	39,3
6. Antraceno	3	178	216	340	1,29	4,57	4,4	2,7	7,5x10 <sup>-4</sup>	49,7
7. Fluoranteno	4	202	111	-	0,26	5,2	4,9	3,7	1,2x10 <sup>-3</sup>	11,6
8. Pireno	4	202	149	360	0,15	5,2	-	3,7	8,86x10 <sup>-4</sup>	5
9. Benzo(a)antraceno	4	228	158	400	1,1x10 <sup>-2</sup>	5,84	-	4,2	7,3x10 <sup>-6</sup>	-
10. Criseno	4	228	255	-	3x10 <sup>-3</sup>	5,84	-	4,2	5,7x10 <sup>-7</sup>	-
11. Benzo(b)fluoranteno	5	252	167	-	1,5x10 <sup>-3</sup>	6,6	5,2	5,0	-	12
12. Benzo(k)fluoranteno	5	252	217	480	7,6x10 <sup>-4</sup>	6,8	5,9	4,9	6,0x10 <sup>-7</sup>	0,7
13. Benzo(a)pireno	5	252	179	496	3,8x10 <sup>-3</sup>	6,4	6,0	4,9	7,3x10 <sup>-7</sup>	0,4
14. Indeno(1,2,3-cd)pireno	6	276	163	-	1,9x10 <sup>-4</sup>	6,6	6,8	5,6	-	0,3
15. Dibenzo(a,h)antraceno	5	278	262	-	5,1x10 <sup>-4</sup>	6,7	6,1	5,6	3,7x10 <sup>-10</sup>	0,05
16. Benzo(g,h,i)perileno	6	276	222	-	5,5x10 <sup>-3</sup>	7,04	-	5,6	6,0x10 <sup>-8</sup>	-

<sup>a</sup> MM: Massa Molar<sup>b</sup> PF: Ponto de fusão<sup>c</sup> PE: Ponto de ebulição<sup>d</sup> Solubilidade de uma substância em água é a concentração mássica desta substância na água<sup>e</sup> K<sub>ow</sub>: coeficiente de partição n-octanol/água definido como a razão entre as concentrações de equilíbrio da substância nas 2 fases constituídas de solventes que não se misturam<sup>f</sup> K<sub>oc</sub>: coeficiente de partição carbono orgânico/água definido como a razão entre a quantidade adsorvida de um composto por unidade de massa de carbono orgânico do solo ou sedimento e a concentração deste mesmo composto em solução aquosa em equilíbrio<sup>g</sup> K<sub>d</sub>: coeficiente de partição sedimento/água definido como a razão entre a concentração de um elemento adsorvido no sedimento e a concentração deste mesmo elemento em solução aquosa em equilíbrio<sup>h</sup> Pressão de vapor: pressão de saturação de uma substância líquida ou sólida<sup>i</sup> Constante de Henry traduz a propriedade de uma substância em se distribuir entre 2 fases de um sistema binário ar/água (25°C)

De acordo com a tabela I pode verificar-se que os 16 PAHs da US EPA se caracterizam por uma baixa solubilidade em água. Esta característica, aliada às suas propriedades hidrofóbicas, à sua lipofilicidade e ao valor de  $\log K_{ow}$  que varia entre 3 e 7, permitem justificar o transporte destes compostos para sedimentos de corpos de água (Witt, 1995; Zhang *et al.*, 2007). Através da mesma tabela pode ainda verificar-se que a solubilidade dos PAHs em água é inversamente proporcional ao seu peso molecular e que a volatilidade destes compostos diminui com o aumento do peso molecular. Assim sendo, PAHs de baixo peso molecular são mais voláteis e possuem elevadas pressões de vapor quando comparados com os de peso molecular mais elevado.

Geralmente, os PAHs estão divididos em três categorias de acordo com a sua génese:

- **Pirogénicos:** produzidos por processos de pirólise ou combustão, caracterizam-se por terem um elevado peso molecular (Wang *et al.*, 1999; Zeng & Vista, 1997);
- **Petrogénicos:** provenientes do petróleo e seus derivados, caracterizam-se por uma predominância de PAHs de baixo peso molecular (2-3 anéis) e PAHs alquilados;
- **Biogénicos:** alguns PAHs, como o perileno, são formados na sua grande maioria por processos de diagénese a partir de precursores biogénicos (Venkatesan, 1988).

Os PAHs presentes nos sedimentos marinhos podem ainda passar por um processo de biodegradação devido à acção de bactérias e fungos. Todo este processo de degradação biológica dos PAHs está condicionado por factores como a disponibilidade de nutrientes, concentração de PAHs e dos microorganismos. A própria estrutura do composto determina a sua biodegradação, uma vez que PAHs com um menor número de anéis oferecem uma menor resistência à sua degradação, enquanto compostos constituídos por um número mais elevado de anéis oferecem uma maior resistência à biodegradação (Li *et al.*, 2007). Para além disso, como os PAHs são susceptíveis de sofrer alterações, como o processo de alquilação (introdução de grupos alquil ou aril -R por substituição ou adição, em compostos orgânicos), o grau de alquilação constitui outro factor que condiciona a taxa de

degradação dos PAHs, uma vez que compostos com menor alquilação permitem uma maior taxa de biodegradação (Page *et al.*, 1995).

Recentemente, os PAHs alquilados têm vindo a provar ser úteis na determinação da impressão digital (*fingerprint*) relacionada com os petróleos por comparação das suas magnitudes individuais relativas em sedimentos (Baumard *et al.*, 1998a).

Amostras ambientais que contém PAHs e sofreram processos de evaporação, dissolução, degradação biológica ou foto-oxidação apresentam concentrações destes compostos distintos das amostras ambientais que não foram alvo destes processos, nomeadamente:

- A abundância relativa dos naftalenos diminui em relação aos fluorantenos, fenantrenos, dibenzotiofenos e crisenos, pois os primeiros são mais susceptíveis de degradação;
- O padrão de distribuição dos isómeros dos naftalenos, fenantrenos e dibenzotiofenos altera-se: em vez de uma distribuição gaussiana, com concentração máxima nos isómeros alquilados com 2 e 3 carbonos (C2 e C3 PAHs alquilados) para uma distribuição crescente com concentração máxima para o isómero de maior alquilação (PAH parental  $C_0 < C_1 < C_2 < C_3$ ). Isto ocorre porque os isómeros de maior alquilação são mais resistentes à degradação (Page *et al.*, 1995).

Page *et al.* (1996) utilizaram a relação entre C2, C3-fenantrenos e C2, C3-dibenzotiofenos para discriminar quantitativamente o derrame do petroleiro Exxon Valdez a partir de fontes locais de poluição.

Os PAHs presentes nos derrames de petróleo são quase exclusivamente compostos homólogos alquilados de C1 a C4, em particular dos PAHs parentais naftaleno, fenantreno, dibenzotiofeno, fluoreno e criseno (Wang & Fingas, 2003), justificando assim a sua importância na monitorização ambiental.

### 1.3 (Bio)disponibilidade

Os estudos ambientais de áreas potencialmente contaminadas, por exemplo por hidrocarbonetos, devem para além da detecção e quantificação destes compostos em sedimento e água, abranger uma abordagem que permita verificar a sua

biodisponibilidade. Este tipo de estudo tem como intuito permitir estabelecer uma relação entre as concentrações dos hidrocarbonetos no meio ambiente e nos tecidos dos seres vivos.

A concentração dos PAHs nos seres vivos é determinada pelo equilíbrio entre a sua aquisição (*uptake*), que está condicionada pela biodisponibilidade do composto e do tipo de alimentação do organismo, e a sua eliminação. Este *uptake* é, em primeiro lugar, regulado pela biodisponibilidade, que também está associado à sua solubilidade em água. Tendo em conta que os PAHs são hidrofóbicos, tendem a adsorver em partículas e assim sendo, a sua solubilidade decresce (Neff, 1979). Como a solubilidade dos PAHs decresce com o aumento da massa molar, a sua bioacumulação nos organismos é geralmente superior para os compostos de massa molar mais baixa que apresentam maior solubilidade em água (Djomo *et al.*, 1996).

Bioacumulação constitui o aumento progressivo da incorporação num organismo de um poluente por via directa ou por via alimentar (organismos aquáticos) de acordo com Rocha (2013).

Esta acumulação dos PAHs em organismos que se alimentam directamente do sedimento ou vivem em contacto com o sedimento, deste modo mais expostos aos contaminantes, é maior que em organismos que se alimentam de outros organismos que estão menos expostos aos PAHs (Baumard *et al.*, 1998a). Contudo, esta relação entre os níveis externos e internos nos tecidos/fluídos dos organismos e mesmo os seus efeitos adversos de exposição aos PAHs não está totalmente elucidada. Apesar dos impactos dos PAHs no ambiente aquático serem extensamente estudados, estes ainda não se encontram totalmente esclarecidos (Van der Oost *et al.*, 2003).

## 1.4 Os Estuários e a sua Importância

A palavra estuário é originária do latim *aestuarium*. Muitas definições têm sido propostas para os estuários. Um estuário pode ser definido como “um corpo de água semi-fechado que possui uma conexão com o mar e em que a água salgada se dilui de um modo mensurável com a água doce proveniente da drenagem continental”. Esta definição exclui diversos tipos de estuários, nomeadamente os que são temporariamente isolados do mar durante a estação seca e os estuários hipersalinos, entre outros. Mais recentemente, Day (1981) define um estuário como: “Um corpo de

água que se encontra permanentemente ou periodicamente aberto ao mar e no seio do qual existe uma variação mensurável da salinidade devido à mistura de água salgada com água doce proveniente da drenagem terrestre”. Em termos genéricos um estuário é portanto uma região de interface entre um rio e o oceano. Este conceito implica o estabelecimento e a realização de importantes e complexas interações entre os dois meios postos em contacto (Ré, 2000).

As definições de estuário mais aceites baseiam-se nos padrões de variação da salinidade. Um estuário pode ser considerado como uma região de mistura de massas de água de salinidade diferente. Os factores dominantes, no que diz respeito à distribuição de salinidades e padrões de circulação nos estuários são a geomorfologia, o fluxo de água doce e a amplitude das marés. O fenómeno de diluição de água marinha em água doce, aos quais correspondem gradientes de densidade, determina em grande medida os padrões de estratificação vertical e o sistema de circulação estuarina. O balanço hidrológico, considerado em termos da importância relativa do caudal fluvial e do prisma de maré (definido como o volume de água movimentado entre a praia-mar e a baixa-mar) permite avaliar a importância da circulação estuarina. A salinidade tem uma importância preponderante na distribuição dos organismos (vegetais e animais) que se encontram nos estuários e que vivem na massa de água. É no entanto muito menos importante para os organismos que se encontram no interior dos sedimentos. A variação da salinidade intersticial (salinidade da água existente nos interstícios do sedimento) é consideravelmente mais reduzida relativamente aos limites de variação da salinidade nas massas de água (Ré, 2000).

Os estuários são áreas de grande preocupação, a nível do risco ecológico e ambiental, devido à sua elevada sensibilidade às diferentes formas de contaminação. Constituem ainda zonas preferenciais de desenvolvimento populacional. De facto, estes estão sujeitos a pressões antropogénicas constantes de diferentes fontes, tais como a agricultura, a pesca, a indústria e o tráfego marítimo. Para além disso, o facto de serem sistemas de transição, torna-os sistemas muito complexos. Os estuários estão também sujeitos a descargas regulares de águas residuais, de diversas origens urbanas e industriais, muitas delas contendo contaminantes ambientais persistentes. A complexidade destas áreas marítimas deve-se também ao facto de serem semifechadas, com uma capacidade de autorrenovação limitada e com uma elevada instabilidade (Costa *et al.*, 2011; Fernández-Tajes *et al.*, 2010; Chen & White, 2004;

Caeiro *et al.*, 2005). Os estuários possuem também um papel importante nas cadeias tróficas aquáticas, isto porque é aí que muitas espécies de peixes pelágicas e bênticas se vão alimentar (Ré, 2000). Para além destas espécies existem outras não aquáticas, como alguns mamíferos ou aves que também recorrem aos estuários para se alimentar, reproduzir e nidificar.

Os contaminantes que chegam aos estuários podem ser retidos em sedimentos e ressuspensos na coluna de água formando uma mistura ambiental complexa. Esta mistura pode ter diversos efeitos adversos (mutagénicos, genotóxicos e carcinogénicos), nos organismos expostos dada a grande persistência de alguns contaminantes. Além da exposição humana directa, os contaminantes também podem chegar ao Homem por via indirecta, através da bioacumulação desses contaminantes nas espécies aquáticas presentes nos estuários que fazem parte da cadeia alimentar (Fernández-Tajes *et al.*, 2010).

Os contaminantes descarregados nos estuários têm uma propensão para se ligarem às partículas de matéria, e consequentemente a acumularem-se nos sedimentos. Este processo de acumulação pode variar de acordo com as características dos sedimentos estuarinos, como por exemplo, a sua composição química e granulometria (Chen & White, 2004). Alguns estudos sugerem também que a maioria dos contaminantes se encontra relacionada com os depósitos finos predominantemente ricos em matéria orgânica (Chen & White, 2004; Mil-Homens *et al.*, 2007). A tendência observada é que quando o grão diminui, as concentrações de nutrientes e contaminantes aumentam. Esta tendência primária é devido ao facto das pequenas partículas terem grandes áreas de superfície para a adsorção. Na tabela II é apresentada a classificação granulométrica de acordo com Wentworth (1922).

**Tabela II** - Classificação granulométrica dos sedimentos (Escala Granulométrica de acordo com Wentworth (1922)).

Classificação	Phi ( $\phi$ )*	(mm)
Areia muito grossa	-1 a 0	2 a 1
Areia grossa	0 a 1	1 a 0,50
Areia média	1 a 2	0,50 a 0,250
Areia fina	2 a 3	0,250 a 0,125
Areia muito fina	3 a 4	0,125 a 0,0625
Silte	4 a 8	0,0625 a 0,00391
Argila	8 a 12	0,00391 a 0,00024

\* Phi ( $\phi$ ) corresponde à unidade de medida do diâmetro da partícula do sedimento, cuja equivalência em milímetros (mm) é apresentada.

Além disso, a ocorrência de variações nas características físicas e químicas do meio (como pH, salinidade, conteúdo de quelantes orgânicos, entre outras) pode libertar um poluente incorporado ao sedimento. Portanto, mudanças nas condições ambientais e dragagens podem tornar os sedimentos em fontes de contaminação (Soares *et al.*, 1999).

A contaminação dos sedimentos também é considerada uma fracção importante da pressão existente à saúde do próprio ecossistema, sendo desta forma necessária uma avaliação periódica da qualidade desses sedimentos, de modo a verificar se existe algum risco ou perigo para o ecossistema em análise. Esta avaliação pode ser realizada no sedimento total ou em extractos de sedimento, recorrendo a diversos testes e não apenas à análise química do sedimento. Actualmente destaca-se a utilização de bioensaios para a avaliação dos riscos, que se tornaram importantes na consequente adopção de estratégias para a monitorização para os ecossistemas (Chen & White, 2004; Caeiro *et al.*, 2005). No entanto, a análise a partir dos sedimentos é um desafio, sobretudo devido à diversificada constituição dos sedimentos, em material inorgânico, matéria orgânica e partículas minerais. Todos estes factores vão ter influência na biodisponibilidade, toxicidade e na capacidade de adsorção dos contaminantes pelo sedimento (Chen & White, 2004; Mil-Homens *et al.*, 2007). Contudo, não é só a complexidade dos sedimentos que dificulta os bioensaios, existe ainda um conhecimento insuficiente do comportamento dos agentes mutagénicos em mistura no meio ambiente. Devido a este facto, deve-se ter em



atenção quando é efectuada uma avaliação do risco em sedimentos aquáticos, de modo a que esta não seja subestimada (Chen & White, 2004; Staal *et al.*, 2007).

## 1.5 Descrição das áreas de Estudo

### 1.5.1 Estuário do rio Tejo

De acordo com o Modelo Operacional para o Estuário do Tejo ([http://www.mohid.com/tejo-op/sit\\_ref.htm](http://www.mohid.com/tejo-op/sit_ref.htm)) o rio Tejo é o maior rio da Península Ibérica e nasce em Muela de San Juan na Serra espanhola de Albarracin, a 1953 m de altitude. Tem um percurso de 1038 km, dos quais 230 km são em território português. No seu curso inferior, o Tejo tem como afluentes principais os Rios Erges, Aravil, Ponsul, Zêzere, Almonda, Alviela, Maior, Trancão e as ribeiras da Ota, Alenquer e Sacavém na margem direita e os Rios Server, Torto, Alpiarça, Murge, Sorraia, e as ribeiras de Nisa, Alpiarça, Muge, Figueiró, Magos, Montijo e Coina na margem esquerda.

**Localização:** O estuário do Tejo localiza-se perto da capital de Portugal, Lisboa (38° 44' N, 9° 08' W). O estuário do Tejo é o maior de Portugal e um dos maiores e mais importantes estuários da Europa. Ocupa uma área de cerca de 320 km<sup>2</sup> e tem um comprimento de aproximadamente 80 km desde o seu limite superior (perto de Muge) até à sua embocadura (perto de S. Julião da Barra-Bugio). A área submersa varia entre 30000 ha em marés de águas mortas e 34000 ha em marés de águas vivas.

**Morfologia:** Com base nas suas características morfológicas, o **Estuário do Tejo** pode ser dividido em três zonas:

- **O troço superior**, uma zona pouco profunda que consiste num delta interior, com extensas áreas de espraiado de maré e de sapal. Esta região engloba na sua quase totalidade, a Reserva Natural do Estuário do Tejo, sendo a riqueza biológica desta área enorme. É a zona de *nursery* mais importante do estuário e alberga anualmente cerca de 100000 aves invernantes.
- **O troço central** é o mais largo do Estuário. Tem uma profundidade média de 7 m e é onde vêm desaguar rios e ribeiras e onde se localizam os grandes empreendimentos industriais que circundam o estuário.

- **O troço terminal** contrasta por ser um canal profundo e estreito. Nas suas margens localizam-se as cidades de Lisboa e Almada. A zona terminal começa a dar lugar a uma extremidade mais apertada que entra em contacto com as águas marinhas do Oceano Atlântico.

A principal fonte de água doce é o rio Tejo, com contribuições mais pequenas de outros rios como o Trancão ou o Sorraia. Os padrões de descarga do rio dependem da estação do ano, de variações inter-anuais e da regularização com Espanha, variando a descarga média entre os 100 e os 2200 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>. O tempo de residência da água doce no estuário é variável, sendo de 65 dias para uma descarga de 100 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> e de 6 dias para uma descarga de 2200 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>.

Como outros estuários, o estuário do Tejo é uma zona de elevada produtividade biológica e caracteriza-se pelas flutuações extremas de factores abióticos, nomeadamente da salinidade, temperatura, correntes e turbidez. Estes factores, aliados à alternância de períodos de imersão e emersão e à grande mobilidade dos sedimentos, produzem um ambiente físico e químico difícil para a fauna e a flora que em conjunto com a heterogeneidade dos habitats condiciona a diversidade dos organismos vivos.

**Vegetação de Sapal:** As áreas de sapal, tipicamente associadas às zonas estuarinas, englobam elementos florísticos únicos e desempenham um papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos, assegurando um intercâmbio de energia entre os meios terrestre e aquático. Os sapais do Tejo ocupam uma área de 13 km<sup>2</sup> e têm sido objecto de vários estudos fitossociológicos. A espécie mais abundante é *Spartina maritima*, sendo colonizado ainda por *Halimione portulacoides*, *Arthrocnemum fruticosum* e *Arthrocnemum perene*.

**Reserva Natural:** As populações estuarinas são muito vulneráveis às perturbações do seu habitat que incluem poluição, dragagens, drenagens e aterros, alteração nos caudais de água doce e dos regimes de maré e sobreexploração dos recursos vivos. Devido à sua importância económica e ecológica, os estuários têm vindo a ser alvo de particular atenção em diversos tratados internacionais, convenções e directivas de conservação da natureza. A Reserva Natural do Estuário do Tejo, criada em 1976 pelo Decreto-Lei 565/76, de 19 de Julho, abrange águas estuarinas, zonas de lamas e sapais, os mouchões (da Póvoa, de Alhandra, do Lombo do Tejo e das Garças), salinas, pastagens e terrenos agrícolas. A sua inclusão no conjunto das dez zonas

húmidas mais importantes da Europa deve-se essencialmente ao seu valor como habitat de aves aquáticas, cujo património é extraordinário, para além do seu papel primordial na manutenção dos *stocks* costeiros de pescado.

Em termos de amostragem, foram considerados 22 pontos, concentrados essencialmente em duas áreas, potencialmente mais sujeitas a impactos por acção antropogénica: a primeira, localizada na margem norte do estuário, entre Santa Iria da Azoia e Vila Franca de Xira, englobando as estações 7, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 17 e 18; a segunda, situada na margem sul, na baía do Seixal, e constituída pelas estações 1, 2, 3, 4, 5 e 6. As outras estações distribuem-se pelo restante estuário.

Relativamente à baía do Seixal, é uma zona bastante confinada que apresenta, na sua zona mais ocidental uma extensa mancha de sapal, com aproximadamente 143 hectares, denominada sapal de Corroios (Costa, 2010), sendo a zona húmida mais bem conservada de todo o estuário do Tejo, a sul de Alcochete, estando classificada como Domínio Público Hídrico e incluída na Reserva Ecológica Nacional (REN).

O sapal de Corroios é uma área sujeita à influência das marés com manchas de vegetação estuarina relativamente extensas (Costa, 2010). Aqui as plantas vivem numa situação de secura fisiológica, uma vez que a elevada concentração salina do meio lhes dificulta o acesso à água (embora esta seja abundante). Para sobreviverem, estes organismos desenvolveram várias adaptações morfológicas, tais como: a redução da área foliar e o aumento da suculência das folhas e caules, o aumento da densidade radicular, um denso revestimento de células secretoras de sal e a protecção dos órgãos aéreos por uma espessa cutícula. Por outro lado, embora os sais absorvidos possam, em parte, ser expelidos através das raízes, o excesso pode ser segregado por glândulas especiais existentes nas folhas; quando estas secam, as glândulas expulsam o sal, que fica a revestir a superfície das mesmas. Possuem ainda, um mecanismo fisiológico de ajustamento osmótico (osmoregulação) que evita a acumulação de sais nas células.

As espécies halófitas mais representativas presentes no sapal de Corroios são a morraça (***Spartina maritima***), a gramata-branca (*Halimione portulacoides*), as gramatas (*Sarcocornia fruticosa* e *Sarcocornia perennis* (Caçador *et al.*, 2007).

### 1.5.2 Ria Formosa

A Ria Formosa localiza-se no extremo Meridional de Portugal na costa Sul do Sotavento Algarvio. Estende-se por uma faixa litoral de cerca de 60 Km, desde Ancão até à praia da Manta Rota, abrangendo na sua totalidade uma área aproximada de 18400 ha (Programa de Ordenamento e Desenvolvimento da Ria Formosa, 1984). Constituiu-se como uma área protegida com o estatuto de Parque Natural criado pelo Decreto-Lei n.º 3731/87, de 9 de Dezembro. As amostras em estudo desta região serviram como estações de referência, tendo em conta que é uma região com uma menor acção antropogénica.

**Geomorfologia:** A Ria Formosa constitui um sistema lagunar separado do mar por um cordão dunar litoral, sensivelmente paralelo à orla continental, formado por penínsulas e ilhas das quais se destacam pela sua importância e dimensão e seguindo o sentido Oeste – Este; as ilhas da Barreta, Culatra, Armona, Tavira e Cabanas. Este cordão arenoso protege da influência directa do mar uma vasta área de sapal e inúmeros canais e ilhotes criando condições particulares (Plano de Ordenamento do parque Nacional da Ria Formosa, 1986). Relativamente à vegetação de sapal, apresenta uma distribuição bastante distinta da observada no Estuário do rio Tejo, sendo possível distinguir três tipos de formação: o sapal baixo, o sapal médio e o sapal alto (PODRF, 1984):

- **O sapal baixo**, caracterizado pela presença de *Spartina maritima*. A contínua deposição de sedimentos provoca a elevação da parte superior desta zona, que é parcialmente invadida, sendo a *Spartina* substituída por espécies com preferência por substratos mais elevados e menos salinos dos géneros *Limonium*, *Salicornia* e *Suaeda*. É ainda típico do sapal surgirem comunidades, em faixas ou mosaico, dominadas pelo *Atriplex portucalooides* pertencentes à associação *Atriplicetum portucalooides*;
- **O sapal médio**, essencialmente constituído por espécies subarborescentes pertencentes às associações *Arthrocnemum glauci* e *Sarcocornia perennis*, dominadas pelo *Arthrocnemum glaucum* e *Sarcocornia perennis* respectivamente;
- **O sapal superior**, caracterizado pelas associações *Limonium ovalifolii* – *Limoniastrum monopetali* e *Polygonum equisetiformis* – *Limoniastrum monopetali*.

## Capítulo II: Metodologia de Análise

Para a elaboração de um estudo de investigação fiável e robusto é imprescindível o planeamento, o estudo meticoloso e um procedimento experimental que tenha como alvo os objectivos do trabalho. No caso presente, todo este planeamento e estudo abrange aspectos que vão desde a descontaminação do material utilizado em laboratório até às conclusões elaboradas a partir dos resultados obtidos no decorrer do estudo, passando pela adequada selecção do equipamento de amostragem, o armazenamento e a optimização dos métodos/técnicas utilizados. É ainda essencial uma análise crítica aos resultados e a valorização da criação de métodos inovadores que assegurem o consumo mínimo de reagentes e a utilização de quantidades ínfimas de amostras, de modo a assegurar uma perturbação do meio ambiente tão pequena quanto possível, sem que seja colocada em causa a qualidade dos resultados obtidos.

### 2.1 Amostragem de Sedimento

No total, foram incluídas neste estudo 30 amostras de sedimento superficial (restritas aos primeiros 10 cm de profundidade) recolhidas nos anos de 2009, 2010 e 2011. Foram amostradas 18 estações no rio Tejo (9 no estuário, 3 fora do estuário e 6 na Baía do Seixal) e 4 estações na Ria Formosa (figura 2).



Fig. 2 - Estações de amostragem para o sedimento, com base nas coordenadas geográficas descritas na tabela III.

Na tabela III são apresentadas as coordenadas geográficas das estações de amostragem obtidas através de um sistema portátil GPS referenciadas ao *datum* WGS 84. Na tabela IV estão descritos os anos correspondentes à amostragem.

**Tabela III** - Registo das estações de amostragem, localização e respectivas coordenadas geográficas.

Est.	Localização	Coordenadas <i>datum</i> WGS 84	
		Latitude (N)	Longitude (W)
Estuário do rio Tejo			
1	Entrada da baía	38° 38' 53" N	9° 06' 00" W
2	Canal de navegação (jusante)	38° 38' 34" N	9° 06' 42" W
3	Canal de navegação (montante)	38° 38' 08" N	9° 06' 44" W
4	Braço Sul da baía	38° 38' 27" N	9° 06' 59" W
5	Sapal	38° 39' 00" N	9° 07' 32" W
6	Sapal	38° 38' 35" N	9° 08' 18" W
7	Topo Sul Mouchão Tejo	38° 52' 36" N	9° 01' 16" W
8	Cala Norte junto ao centro do Mouchão da Póvoa	38° 49' 40" N	9° 04' 44" W
9	Cala das Barcas	38° 49' 06" N	9° 03' 02" W
10	Vala (de escoamento para o estuário, junto à Est. 8)	38° 49' 46" N	9° 04' 56" W
11	Muge ( <b>estação de referência estuário - montante</b> )	39° 06' 15" N	8° 43' 51" W
12	Vila Franca de Xira	38° 57' 09" N	8° 59' 13" W
13	Cacilhas	38° 41' 48" N	9° 09' 00" W
14	Barra Sul ( <b>estação de referência estuário - jusante</b> )	38° 37' 26" N	9° 23' 06" W
15	Soda Póvoa – Cala Norte Topo Norte do Mouchão da Póvoa	38° 51' 28" N	9° 03' 35" W
16	Início do Canal do Barreiro	38° 39' 44" N	9° 06' 08" W
17	Esteiro de Coína	38° 38' 52" N	9° 04' 28" W
18	Esteiro da Moita	38° 40' 36" N	9° 01' 10" W
Ria Formosa			
19	Canal de Olhão	37° 01' 04" N	7° 50' 40" W
20	Faro-Olhão (barra)	36° 58' 14" N	7° 52' 07" W
21	Faro-Olhão (zona exterior acesso à barra)	36° 57' 08" N	7° 51' 30" W
22	Canal de Faro (cais comercial)	36° 59' 50" N	7° 54' 46" W

**Tabela IV - Plano de amostragem relativo às colheitas efectuadas.**

Est./ano	2009	2010	2011
1	06 de Fev.		
2			
3		22 de Mar.	
4			
5			
6		05 de Abr.	
7		03 de Set.	07 de Set.
8			
9			
10			
11		02 de Set.	
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19		30 de Set.	
20			
21			
22			

No conjunto de amostras recolhidas ao longo do Estuário do rio Tejo, foram abrangidas as principais zonas sujeitas à acção antropogénica, em que, como já foi referido, foram consideradas com maior incidência duas áreas potencialmente problemáticas: a zona industrial da margem Norte e a baía do Seixal (figura 3).

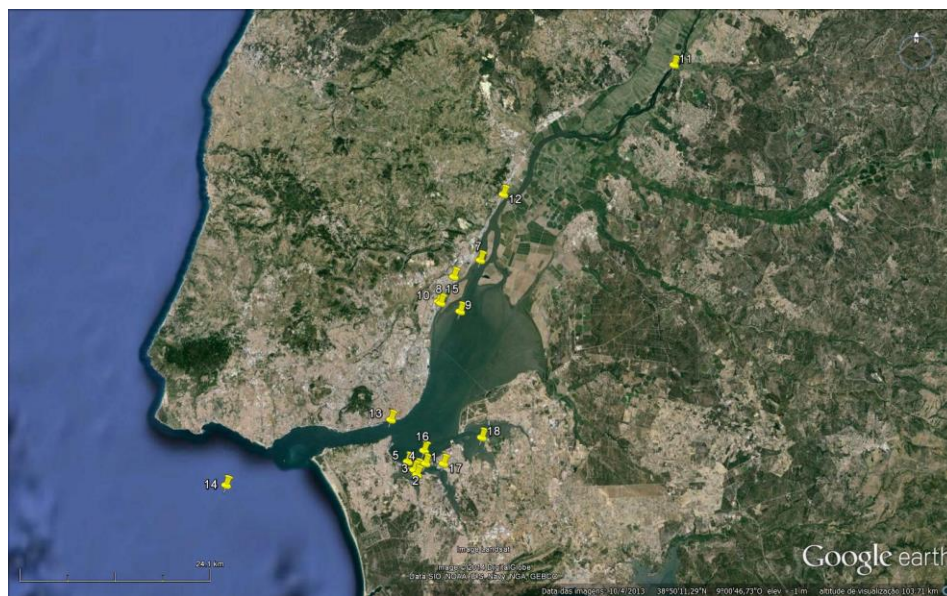


Fig. 3 - Estações de amostragem de sedimento do Estuário do rio Tejo (1 a 18).

A estação mais a montante (11) e a estação mais a jusante (14) são as estações que devido à sua localização podem ser consideradas as de referência.

Relativamente às estações escolhidas na Ria Formosa (figura 4) é de salientar o facto da existência de duas zonas distintas. As estações 20 e 21 estão situadas em zonas onde existe uma maior dinâmica, com uma frequente ressuspensão das camadas de água e consequentemente dos seus sedimentos (entrada da ria) e as estações 19 e 22 situadas em cais de navegação, com maior exposição a efeitos antropogénicos, no entanto inferiores aos registados para o rio Tejo.





Fig. 4 - Estações de amostragem de sedimento na Ria Formosa (19 a 22).

A colheita das amostras de sedimento no rio Tejo e na Ria Formosa foi efectuada recorrendo a meios da Marinha (figura 5), usando dragas do tipo *Smith-McIntyre* e *Petit Ponar* (figura 6 (a) e (b) respectivamente).



Fig. 5 - Navio Fisália e semi-rígida.



Fig. 6 - Draga (a) *Smith-McIntyre* e (b) *petit ponar*.

De forma a garantir a minimização da actividade biológica, as amostras de sedimentos superficiais foram armazenadas em contentores adequados em ambiente refrigerado e ao abrigo da luz até entrega no laboratório e, depois, por congelação a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem preparadas para análise.

## 2.2 Metodologias Analíticas

Tendo em conta que o objectivo deste estudo visava a obtenção dos teores de PAHs, e dado que a técnica escolhida foi a GC-MSD foi necessário proceder a toda a preparação das amostras de modo a permitir alcançar as condições necessárias para a execução desta técnica em particular. Desta forma, depois da recolha das amostras foi necessário seguir uma sequência de passos fundamentais a essa preparação, que se encontram descritas nos pontos seguintes, começando pela parte que diz respeito às amostras de sedimento.

### 2.2.1 Tratamento das Amostras de Sedimento

O objectivo principal na preparação das amostras de sedimento foi a adequação da matriz (sedimento) ao método de análise utilizado, neste caso específico a Cromatografia Gasosa. Durante esta fase de preparação foi fundamental assegurar que as amostras não sofriam qualquer tipo de degradação, de modo a preservar as suas características nativas. Por outro lado, foi ainda essencial a eliminação de contaminantes nas amostras (como, por exemplo, pigmentos ou gorduras) que dificultam/impedem a quantificação dos PAHs e que constituem um dos maiores desafios analíticos nesta área.

Esta preparação abrangeu todos os procedimentos que se realizaram a cada uma das amostras desde a sua entrada no laboratório até ao seu devido armazenamento para posterior análise. Esta sequência de preparação dos sedimentos incluiu a peneiração, a liofilização, a moagem das amostras e posterior armazenamento de acordo com o fluxograma seguinte (figura 7) de acordo com ASTM (2008), IOS (2003), OSPAR (1995; 2002), UNEP (2006), US EPA (2001):

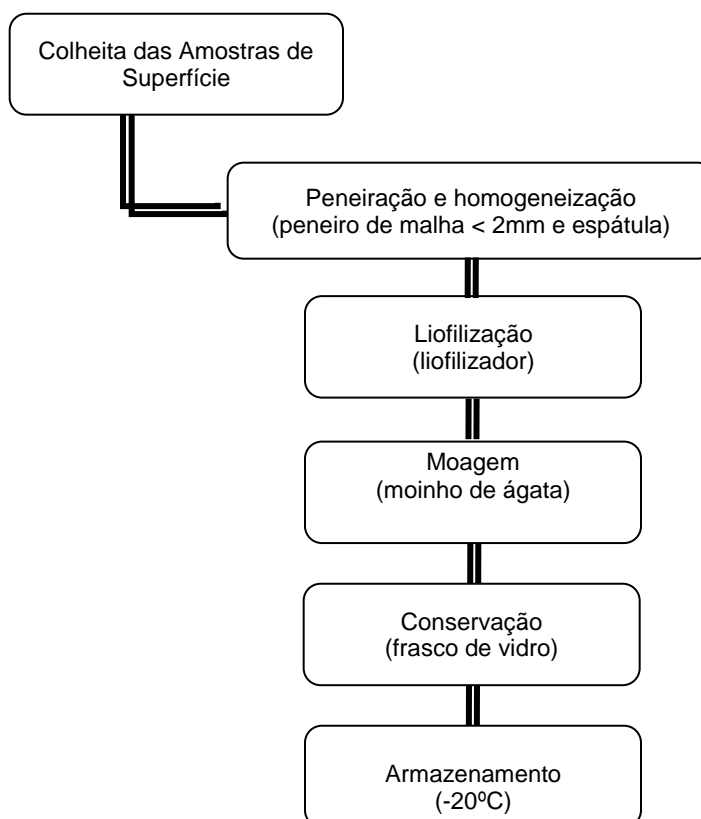


Fig. 7 - Fluxograma relativo à pré-preparação das amostras de sedimento.

### 2.2.1.1 Peneiração das Amostras de Sedimento

A peneiração das amostras de sedimento foi efectuada manualmente por via húmida com o recurso a peneiros de malha de 2mm, de modo a separar da amostra todos os materiais que não faziam parte desta matriz bem como grãos de maior dimensão (cascalho, seixo e bloco). Foi usada a totalidade da amostra recolhida para garantir a sua representatividade.

Foi utilizada esta fracção, uma vez, que corresponde à fracção areia (até 2mm) de acordo com a classificação dos solos baseados em critérios granulométricos (Wentworth, 1922). Apenas foram utilizados materiais que não interferissem com a

composição das amostras para a análise em questão, tais como peneiros em aço inoxidável, tinas de vidro (colectores) e espátulas em metal.

As amostras peneiradas foram guardadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até à sua liofilização em caixas de *Petri*.

#### 2.2.1.2 Liofilização das Amostras de Sedimento

A liofilização constitui o processo de remoção de água da amostra em condições de baixa pressão e temperatura, de modo a assegurar a inexistência de interferências com os compostos/analitos da própria amostra e a garantir que não há perda dos analitos por volatilização.

Foi utilizado um Liofilizador Labconco LyphLock 1L, a uma pressão extremamente baixa (aproximadamente  $5\text{ }\mu\text{m Hg}$ ) e a uma temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram liofilizadas durante 3-4 dias, até se verificar que as amostras já estavam totalmente secas.

### 2.3 Amostragem de *Spartina maritima*

Foram incluídas neste estudo amostras de *Spartina maritima*, inicialmente recolhidas no Estuário do rio Tejo e mantidas em perlite. A perlite é um material inerte que possibilita o arejamento da raiz, isto é, a oxigenação da raiz. Até à data de recolha foram mantidas numa estufa protegidas da luz directa e regadas todos os dias.

#### 2.3.1 Experiências de *Spartina maritima*

Nas amostras de *Spartina maritima* (figura 8): foi incluída uma amostra **controlo** - *Spartina maritima* submersa em água ultrapura; uma amostra **P3** - *Spartina maritima* submersa numa solução de concentração P3 ( $0,10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ); uma amostra **P5** - *Spartina maritima* submersa numa solução de concentração P5 ( $1,25\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ); uma amostra **P6** - *Spartina maritima* submersa numa solução de concentração P6 ( $2,50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ). As características das soluções são apresentadas na tabela XII. Após 7 dias de exposição as soluções foram trocadas por outras de igual concentração.





**Fig. 8** - Amostra controlo, P3, P5 e P6 de *Spartina maritima*.

Estas amostras foram mantidas numa estufa a uma temperatura de 22°C e com luz constante conforme apresentado na figura 9.



**Fig. 9** - Estufa com as amostras de *Spartina maritima*.

## 2.4 Moagem/Laminação das Amostras

As amostras de sedimento, depois de liofilizadas, foram moídas num moinho de ágata até serem reduzidas a um pó muito fino. Este processo é fundamental para assegurar uma posterior extracção eficiente, em que se deve ter a maior área de contacto possível entre as amostras em pó e os extractantes adequados. As amostras de *Spartina maritima*, depois de recolhidas, foram devidamente lavadas (figura 10), de modo a eliminar a perlite, passadas por água ultrapura, separadas entre raiz e parte aérea e foram submetidas a um moinho de lâminas.



Fig. 10 - Processo de lavagem da *Spartina maritima*.

### 2.4.1 Conservação e Armazenamento

As amostras de sedimento, depois de liofilizadas e moídas foram colocadas em frascos de vidro e conservadas a 4°C; as amostras de *Spartina maritima*, depois de laminadas foram colocadas em caixas de *Petri* e conservadas a 4°C. Desta forma foi garantida a conservação das amostras recolhidas e prontas para análise.

## 2.5 Determinação do Peso Seco

As amostras em estudo, tanto para o sedimento como para a *Spartina maritima*, são recolhidas no seu estado nativo, ou seja, com uma determinada percentagem de água na sua constituição. No entanto, de modo a uniformizar resultados e permitir a sua comparação com outros resultados publicados, torna-se necessária a determinação do peso seco ou da percentagem em humidade, para além de se dever indicar o modo de apresentação dos resultados, se em base seca ou em base húmida.

As amostras, tanto de sedimento como de *Spartina maritima*, foram submetidas a um processo de sucessivas secagens numa estufa a  $105 \pm 5^\circ\text{C}$  até se obter uma massa constante, de modo a conseguir determinar o seu peso seco e/ou percentagem de humidade.

No caso das amostras em estudo, e utilizando 1 g de amostra, foram necessárias duas secagens, a primeira de 16 h e a segunda de 1 h, uma vez que após este aquecimento adicional a variação da massa se situou abaixo de 0,5% ( $\text{m m}^{-1}$ ) ou em 2 mg, de acordo com os critérios de aceitação do método instituídos no laboratório.

A diferença em massa registada antes e após o processo de secagem foi utilizada para calcular o peso seco de acordo com a seguinte equação baseada na norma EN 12880:2000:

$$(P_{\text{seco}})(\text{g kg}^{-1}) = \frac{(m_c - m_a)}{(m_b - m_a)} \times f$$

em que,

$P_{\text{seco}}$ : peso seco ( $\text{g kg}^{-1}$ );

$m_a$ : massa da caixa de *Petri* vazia (g);

$m_b$ : massa da caixa de *Petri* contendo a amostra de sedimento húmida (g);

$m_c$ : massa da caixa de *Petri* contendo a amostra de sedimento seca (g);

f: factor de conversão  $f = 1000$ , para a expressão dos resultados em  $\text{g kg}^{-1}$ .

## 2.6 Determinação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

Após a conclusão de toda a parte de preparação das amostras foi possível prosseguir para a detecção e determinação dos PAHs por GC-MSD.

### 2.6.1 Reagentes e Padrões

Para esta análise foi necessário a utilização dos solventes, reagentes sólidos e padrões descritos nas tabelas V, VI e VII.

**Tabela V** - Registo das características de cada um dos solventes utilizados na actividade laboratorial.

Composto	Fórmula química	Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Marca	Pureza (%)
Acetona	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	58,08	Merck	99,8
Diclorometano (DCM)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	84,93	Merck	99,8
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	32,04	Merck	99,9
<i>n</i> -hexano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	86,18	Merck	98,0

**Tabela VI** - Características de cada um dos reagentes sólidos utilizados na actividade laboratorial.

Composto	Fórmula química	Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Marca	Pureza (%)
Cobre em Folha (0,1 mm)	Cu	-	Merck	-
Sílica Gel 60	SiO <sub>2</sub>	60,08	Merck	Extra pure for column chromatography
Sulfato de Sódio Anidro	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142,04	Merck	-
Óxido de Alumínio 90 activo, básico	(0,063-0,200 mm)	-	Merck	-
Terra de Diatomácea (DE)	-	-	Dionex	100%



Tabela VII - Características dos padrões utilizados para a análise por GC-MSD.

Solução mãe	Marca	Pureza (%)	Concentração (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	Solvente
16 PAHs da US EPA*	Ultra Scientific	-	2000	DCM/benzeno (1:1)
1-MN**	Merck	97,00	composto líquido	
2,3,5-MN**	Janssen Chimica	não referida	composto líquido	
DBT**	Fluka	98,00	composto sólido	
2-MPhe**	TCI-EP	não referida	composto sólido	
3,6-MPhe**	Aldrich Chem Co.	97,00	composto sólido	
BeP**	Janssen Chimica	99,00	composto sólido	
Per**	Fluka	99,00	composto sólido	
Padrão Interno ***	Ultra Scientific	-	2000	DCM

\* naftaleno; acenaftileno; acenafteno; fluoreno; fenantreno; antraceno; fluoranteno; pireno; benzo(a)antraceno; criseno; benzo(b)fluoranteno; benzo(k)fluoranteno; benzo(a)pireno; indeno(1,2,3-cd)pireno; dibenzo(a,h)antraceno; benzo(g,h,i)perileno.

\*\* 1-metilnaftaleno (1-MN); 2,3,5-trimetilnaftaleno (2,3,5-MN); Dibenzotiofeno (DBT); 2-metilfenantreno (2-MPhe); 3,6-Dimetilfenantreno (3,6-MPhe); Benzo(e)pireno (BeP) e Perileno (Per).

\*\*\* Padrão Interno (PAHs deuterados): 1,4-Diclorobenzeno-d4 (1,4-CIB); Naftaleno-d8 (N-d8); Acenafteno-d10 (Ace-d10); Fenantreno-d10 (Phe-d10); Criseno-d12 (Chr-d12) e Perileno-d12 (Per-d12).

## 2.7 Extracção

Antes da análise instrumental, por Cromatografia Gasosa acoplada ao Detetor de Espectrometria de Massa (GC-MSD), os PAHs foram extraídos dos sedimentos por aplicação da técnica de Extracção Líquida Pressurizada (PLE), vulgarmente designada por Extracção Acelerada por Solvente (ASE).

No caso das amostras de *Spartina maritima* foi aplicada a técnica de Extracção em Soxhlet de acordo com Khan *et al.* (2008).

### 2.7.1 Extracção Acelerada por Solvente

Esta técnica de extracção baseia-se na utilização de dois solventes orgânicos (acetona e *n*-hexano) que, em condições de elevada pressão e temperatura, permite a remoção quantitativa dos PAHs das matrizes sólidas. Tendo em conta as características hidrofóbicas dos PAHs e, conseqüentemente, a sua baixa solubilidade na água, a sua extracção foi efectuada com uma mistura de solventes orgânicos ligeiramente polar.

A reduzida selectividade da técnica de extracção obriga à posterior purificação dos extractos orgânicos, uma vez que muitos outros componentes químicos sem utilidade

para o estudo – e que podem interferir com a análise dos componentes de interesse – são extraídos em simultâneo.

Todos os reagentes utilizados e mencionados na tabela V eram de qualidade cromatográfica ou, se tal não fosse exigido, de qualidade analítica reconhecida. No entanto, foi sempre efectuada a verificação de cada lote dos solventes usados por GC-MSD de modo a despistar a existência de interferentes/contaminantes.

Todo o restante material utilizado foi material corrente de laboratório, lavado e descontaminado de acordo com os procedimentos instituídos no laboratório.

### **1. Preparação das células de extracção (células de aço)**

A extracção das amostras foi efectuada em matriz liofilizada e moída em moinho de ágata. Foram pesadas com rigor cerca de 15 g de cada amostra e foi registada a massa pesada de modo a utilizar esse valor para os cálculos da concentração dos PAHs. Às cerca de 15 g para cada amostra foram adicionados cerca de 7 g de DE (Terra de Diatomácea), esta mistura foi homogeneizada com o auxílio de uma vareta de vidro e foi transferida para uma célula de aço (do ASE) que já continha um filtro de celulose em cada uma das extremidades.

O ensaio em branco foi constituído por DE apenas, cerca de 8-9 g de DE, de modo a preencher todo o reservatório da célula do ASE.

Para o ensaio da recuperação e da amostra fortificada foram adicionados 50 µL da solução padrão de trabalho de fortificação dos 16 PAHs da US EPA e 50 µL da solução padrão de trabalho de fortificação dos 7 PAHs adicionais (1-metilnaftaleno (1-MN); 2,3,5-trimetilnaftaleno (2,3,5-MN); Dibenzotiofeno (DBT); 2-metilfenantreno (2-MPhe); 3,6-Dimetilfenantreno (3,6-MPhe); Benzo(e)pireno (BeP) e Perileno (Per)).

Teve-se em consideração que a fortificação foi efectuada de modo a que as concentrações dos PAHs de fortificação no extracto final se encontrassem dentro da gama de concentrações aplicada à calibração analítica do GC-MSD.

## 2. Extracção

Cada célula foi submetida a um método de extracção previamente optimizado e cujas condições operacionais se encontram registadas na tabela VIII.

**Tabela VIII** - Condições operacionais para a extracção de PAHs em amostras de sedimento.

Parâmetro	Condição experimental
Pressão	2000 psi
Temperatura	100°C
Tempo de pré-aquecimento	1 min
Tempo de aquecimento	5 min
Tempo estático	5 min
Nº de ciclos	2
Volume de solvente	50% do volume da célula de extracção
Tempo de purga	180s
Solvente	<i>n</i> -hexano:acetona (50:50, v/v)

### 2.7.2 Extracção por Soxhlet

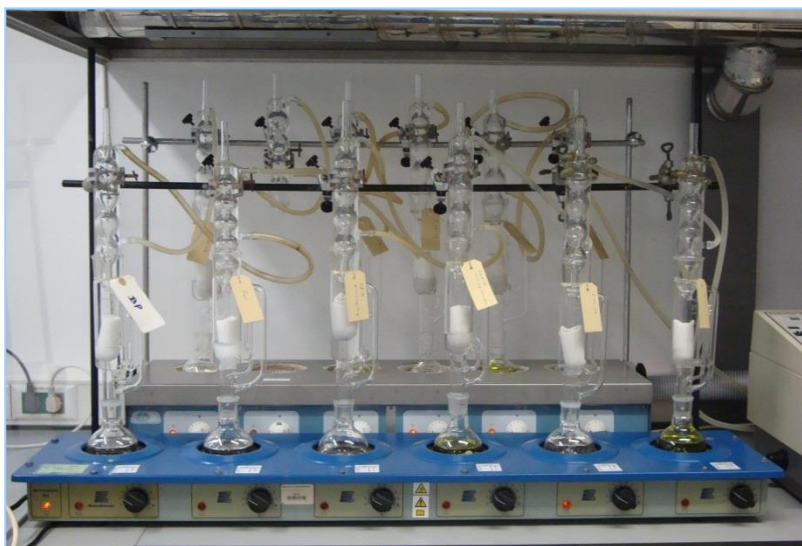
Foram utilizados cerca de 3 g de raiz ou de parte aérea, não sendo possível utilizar uma maior quantidade de amostra devido à sua escassez, a estas, foram adicionadas 2 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de modo a eliminar toda a água existente na amostra de acordo com Khan *et al.* (2008). Esta mistura foi macerada manualmente com a ajuda de um cadinho e um pilão e depois colocada num cartucho de celulose previamente tratado. Os cartuchos foram previamente tratados com *n*-hexano, 15 min no ultra-sónico e colocado a secar numa estufa a 65°C durante o tempo necessário. O cartucho contendo a mistura foi deixado durante uma noite à temperatura ambiente, de modo a permitir a eliminação de toda a água existente na amostra.

Após 16h foi efectuada a extracção em Soxhlet nas condições indicadas na tabela IX, de acordo com Khan *et al.* (2008):

**Tabela IX** - Condições operacionais para a extracção de PAHs em amostras de *Spartina maritima*.

Parâmetro	Condição experimental
Tempo de duração	5 h
Nº mínimo de ciclos	8
Volume de solvente	250 mL
Solvente	DCM
Temperatura	40°C

Após as 5 h, e desde que tivesse ocorrido o número mínimo de ciclos para todas as amostras, o sistema foi desligado e aguardou-se o tempo necessário para que fosse atingida a temperatura ambiente em todo o sistema. Só depois de atingida essa temperatura, o sistema foi desmontado e os extractos obtidos, cuidadosamente transferidos para balões de recolha (figura 11).

**Fig. 11** - Extracção em Soxhlet utilizada nas amostras de *Spartina maritima*.

### 2.7.3 Remoção de Enxofre/Concentração e Purificação dos Extractos

Após a obtenção dos extractos pela técnica de ASE foi efectuada a remoção de enxofre através da adição de tiras de cobre activado. A cada extracto foram adicionadas tiras de cobre activado de acordo com o teor expectável em enxofre, tendo-se adicionado o número de tiras necessário para não se observar qualquer deposição. Deixaram-se repousar os extractos durante uma noite em sistema refrigerado e ao abrigo da luz.

Foi necessário ainda concentrar os extractos (obtidos por ASE e por *Soxhlet*) a um volume inferior a 2 mL para proceder ao passo de purificação, tendo-se utilizado preferencialmente o evaporador rotativo, ou, nos casos em que a sua utilização não foi possível devido a condicionamentos no laboratório, o sistema de evaporação TurboVap®.

No caso do sistema TurboVap® os extractos foram concentrados em banho termostatzado a cerca de 25°C e pressão de azoto regulada para 0,5 bar. No caso do sistema do evaporador rotativo os extractos foram concentrados à mesma temperatura mas em condições de vácuo.

Durante este passo de concentração, teve-se o cuidado particular de não deixar ocorrer evaporação dos extractos até à sua secura, o que poderia levar à perda parcial ou total dos componentes químicos de interesse analítico.

Os extractos resultantes foram posteriormente purificados de modo a garantir a eliminação de componentes que de alguma forma pudessem interferir com a análise subsequente tais como pigmentos e conteúdo de características lipídicas.

Deste modo foi efectuada a purificação dos extractos por cromatografia de adsorção em coluna de Sílica Gel e Alumina Básica, ambas desactivadas a 5%.

As colunas foram lavadas e empacotadas sequencialmente, com a ajuda de *n*-hexano, com 5 g de Sílica Gel desactivada a 5%, 5 g de Alumina Básica desactivada a 5% e Sulfato de Sódio Anidro (de modo a formar uma camada de cerca de 1 cm de espessura) previamente tratado termicamente a 550°C durante 6h, mantendo a torneira de teflon semi-aberta. O empacotamento foi efectuado cuidadosamente de modo a evitar a formação de fissuras e bolhas de ar no seu interior. Teve-se especial atenção para o facto de o nível do solvente/eluente nas colunas nunca atingir os

adsorventes com a consequência de provocar fissuras e bolhas de ar e, deste modo, comprometer a eficácia da purificação.

De seguida, introduziu-se a amostra na coluna, regulando-se a torneira de modo a ajustar o caudal de eluição a uma gota por segundo, aproximadamente.

Ao recipiente contendo o extracto a purificar, adicionaram-se 5 mL de uma solução de *n*-Hexano/Diclorometano (90:10, v/v) de modo a lavar o recipiente de evaporação e recuperar algum extracto que tivesse ficado retido nas suas paredes. Foi repetida a lavagem do recipiente com mais 5 mL da solução.

Foram adicionados ainda 40 mL do eluente *n*-Hexano:Diclorometano (90:10, v/v) à coluna, deixando-se escoar posteriormente a sua totalidade.

## 2.8 Preparação de Extractos e Padrões para Análise Cromatográfica

Os extractos purificados foram concentrados a 2 mL aproximadamente em sistema do TurboVap® (com banho termostatzado a cerca de 25°C e pressão de azoto regulada para 0,5 bar) e transferidos para tubos graduados previamente pesados. O extracto obtido foi concentrado numa corrente de azoto suave até ser reduzido a um volume ligeiramente inferior a 1 mL. A cada extracto foram adicionados 50 µL de padrão interno e depois foram aferidos a peso com *n*-Hexano de modo a obter exactamente 1 mL e tendo em consideração que a massa volúmica deste solvente é de 0,663 g mL<sup>-1</sup> (a 20°C).

Para a análise cromatográfica foram preparados quatro tipos de padrões: padrão mãe, padrões de trabalho, padrões de calibração e padrões de validação/verificação da calibração.

O padrão mãe de Metilnaftalenos (tabela X) foi preparado por diluição a partir dos respectivos reagentes líquidos apresentados na tabela VII.

**Tabela X** - Características do padrão mãe de Metilnaftalenos.

Designação	Composição	Concentração (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	Solvente
Padrão mãe de Metilnaftalenos	1 – MN 2,3,5 – MN	8000	<i>n</i> -hexano

Na tabela XI estão referidos os padrões de trabalho utilizados quer para a fortificação de extractos/amostra quer para a calibração/validação da calibração.

Os padrões de trabalho dos 16 PAHs (US EPA) e internos (PIs) foram preparados por diluição a partir dos respectivos padrões referidos na tabela XI.

O padrão de trabalho de 7 PAHs adicionais foi preparado por dissolução dos reagentes sólidos referidos na tabela VII e por diluição do Padrão mãe de Metilnaftalenos (tabela X).

**Tabela XI** - Características dos padrões de trabalho utilizados para a análise por GC-MSD.

Designação	Composição	Concentração (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	Solvente
16 PAHs da US EPA	16 prioritários US EPA	25,00	<i>n</i> -hexano
7 PAHs adicionais	1-MN; 2,3,5-MN	25,00	<i>n</i> -hexano: DCM (8:2)
	DBT		
	2-MPhe		
	3,6-MPhe		
	BeP		
Padrão interno	Per	25,00	<i>n</i> -hexano
	1,4-CIB; N-d8; Ace-d10; Phe-d10; Chr-d12 e Per-d12		

Durante a análise por GC-MSD foram utilizados os padrões de calibração/verificação (tabela XII) preparados a partir das soluções referidas na tabela XI.

**Tabela XII** - Características dos padrões de calibração e de validação/verificação da calibração.

Padrão		Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Solvente
Calibração	P1	0,01	<i>n</i> -hexano
	P2	0,05	<i>n</i> -hexano
	P3	0,10	<i>n</i> -hexano
	P4	0,50	<i>n</i> -hexano
	P5	1,25	<i>n</i> -hexano
	P6	2,50	<i>n</i> -hexano
	P7	3,75	<i>n</i> -hexano
	P8	5,00	<i>n</i> -hexano
Validação/verificação da calibração	CCVP3	0,10	<i>n</i> -hexano
	CCVP5	1,25	<i>n</i> -hexano

## 2.9 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa

Existe uma ampla variedade de técnicas instrumentais e não instrumentais que são usualmente utilizadas para a análise de hidrocarbonetos, que incluem a cromatografia gasosa (GC), cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), entre outras. De todas as técnicas anteriormente mencionadas a técnica de GC é a mais utilizada. Os métodos de cromatografia gasosa têm vindo a ser melhorados por combinação com técnicas analíticas mais sofisticadas, como a Espectrometria de Massa (de que resulta a técnica hifenada de GC-MS), que permite a análise de biomarcadores específicos de derrames de petróleo e de PAHs a partir de amostras ambientais (Wang & Fingas, 2003).

Esta técnica, GC-MS, permite em simultâneo a separação, identificação e quantificação de muitos constituintes das amostras de petróleo tanto em modo de varrimento contínuo (*full-scan*), como no modo de monitorização de iões seleccionados (Daling & Faksness, 2002).

### 2.9.1 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa

Todos os extractos foram analisados por GC-MSD no sistema Thermo Scientific, constituído por um cromatógrafo gasoso (Trace 1300 Gas Chromatograph) equipado com um injector de vaporização PTV - Programmed Temperature Vaporizing - e com amostrador automático (TriPlus RSH), que se encontrava acoplado ao



detector selectivo de massa (ISQ Single Quadrupole MS). Os resultados finais, assim como todo o controlo instrumental foram obtidos recorrendo ao software Xcalibur™ versão 2.2 SP1.48, programado com métodos de processamento desenvolvidos internamente para a quantificação de PAHs. Na (tabela XIII) encontram-se registadas as condições instrumentais utilizadas para este estudo e na tabela XIV os respectivos iões de identificação e quantificação.

**Tabela XIII** - Condições instrumentais do GC-MSD na caracterização das amostras (sedimento e *Spartina maritima*).

Condições instrumentais do CG-MSD	
<b>Cromatógrafo Gasoso - CG:</b>	
Pré coluna de Sílica: Thermo Scientific (2m x 0,53mm)	
Coluna Capilar: Thermo Scientific TG-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm)	
Forno:	
	60°C por 1min;
	subida de 9°C/min até 100°C (4min);
	subida de 5°C/min até 300°C (30min).
Gás de Arraste: Hélio (Pureza 99,999%); 1,15mL/min	
<b>Injector:</b>	
Modo de injeção: Splitless	
Volume de injeção: 1 µL (seringa Thermo de 10 µL)	
Temperatura do injector:	
	60°C por 1min;
	subida de 14°C/s até 310°C (47min);
	subida de 8°C/s até 330°C (10min).
<b>Detecção por espectrometria de massa - MSD:</b>	
Aquisição dos dados (Solvent delay): 8 min	
Ficheiro Tune: Atune.u	
Interface: 300°C	
Fonte do MSD: Impacto electrónico (EI), 230°C, 70eV	
Aquisição em modo SIM - Selected Ion Monitoring	

Os PAHs estudados foram identificados e quantificados com base nos respectivos iões de identificação e quantificação descritos na tabela XIV.

Tabela XIV - Registo dos iões de quantificação e confirmação dos PAHs em estudo.

Grupo	Analito	Ião de Quantificação (m/z)	Ião de Confirmação (m/z)
2 anéis benzénicos	N-d8	136	-
	N	128 (100%)	102 (11%)
	Ace-d10	164	-
	Acy	152 (100%)	151
	Ace	154 (70%)	153 (100%)
	F	166 (81%)	165 (100%)
3 anéis benzénicos	Phe-d10	188	-
	Phe, A	178 (100%)	176 (20%), 89 (15%)
	Dbt	184	185
	2-MPhe	192	191 (55%)
	3,6-MPhe	206	191 (variável)
3-4 anéis benzénicos	Chr-d12	240	120 (25%), 241(20%)
	BaA	228 (100%)	229 (20%), 226 (25%)
	Fluo, P	202 (100%)	200 (31%), 101 (20%), 203 (15%)
	Chr+Tph	228 (100%)	229 (20%), 114 (20%)
	Per-d12	264	260 (25%), 132 (30%)
4-6 anéis benzénicos	BbF, BkF	252 (100%)	253 (20%), 126 (25%)
	BeP	252 (100%)	250 (30%), 126 (20%)
	BaP	252 (100%)	250 (25%), 126 (20%)
	Per	252 (100%)	250 (25%), 126 (25%)
	Ind	276 (100%)	274 (20%)
	DBA	278 (100%)	279 (25%)
	BghiP	276 (100%)	274 (20%)
Séries homólogas alquiladas	C1-N	142	-
	C2-N	156	-
	C3-N	170	-
	C1-Phe	192	-
	C2-Phe	206	-

## 2.10 Limites Analíticos – Limite de Detecção e de Quantificação

Para o tratamento dos resultados foi necessário inicialmente efectuar o cálculo dos limites do aparelho utilizado. Deste modo, foram calculados os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) através do padrão mais baixo das rectas de calibração de acordo com o Guia RELACRE 13, 2000; ISO 8 466-1:1990 e ISO 8 466-2:2001.

O limite de detecção (**LD**) é o teor mínimo, a partir do qual é possível detectar a presença do analito, isto é, corresponde à concentração mínima a que é possível identificar um analito. O limite de detecção pode ser obtido por:

$$LD = X_0 + 3\sigma_0$$

em que,

$X_0$  – média do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestigiais;

$\sigma_0$  – Desvio padrão associado a  $X_0$ ;

$S_{y/x}$  – desvio padrão residual da curva de calibração;

$b$  – declive da curva de calibração.

Utilizando a fórmula acima descrita foi determinado o LD de 0,0088  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

O limite de quantificação (**LQ**) corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível quantificar o analito. O padrão de menor concentração utilizado na recta de calibração geralmente corresponde ao valor de LQ determinado. O limite de quantificação pode ser determinado por:

$$LQ = X_0 + 10\sigma_0$$

em que,

$X_0$  – média do teor medido de uma série de brancos ou padrões, preparados ao longo de vários dias;

$\sigma_0$  – Desvio padrão associado a  $X_0$ ;

$S_{y/x}$  – desvio padrão residual da curva de calibração;

$b$  – declive da curva de calibração.

Utilizando a fórmula acima descrita foi determinado o LQ de 0,0099  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Considerando que foram utilizados cerca de 15 g da matriz sedimento e cerca de 3 g da matriz *Spartina marítima* foram determinados os LQ correspondentes para estas duas matrizes:

$LQ = 0,7\text{g kg}^{-1}$  bs para sedimento

$LQ = 3,5\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$  bs para *Spartina marítima*

## 2.11 Controlo de Qualidade

Durante todo o processo laboratorial foram respeitadas as normas de laboratório de acordo com NP EN ISO/IEC - 17 025:2005; Guia RELACRE 13, 2000; ISO 8 466-1:1990 e ISO 8 466-2:2001. Foram elaborados os seguintes ensaios:

- Ensaios em branco do processo, que permitiram detectar alguma contaminação existente durante a elaboração laboratorial, para além de ter sido usado para corrigir os resultados das amostras quando o valor do branco foi da ordem do LD do analito em questão. Os brancos obtidos em todos os lotes analisados e para todos os compostos foram baixos e variaram entre 0,000-0,008  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pelo que nunca foi efectuado o desconto do mesmo às amostras;
- Ensaios de recuperação, que permitiram verificar a eficiência do processo/análise e permitiram corrigir os resultados obtidos nos casos em que os ensaios de recuperação foram inferiores a 75% ou superiores a 125%. Apresenta-se na tabela XV o valor médio (n=10), mínimo e máximo das recuperações obtidas;

**Tabela XV** - Valor médio, mínimo e máximo das recuperações para os diversos compostos analisados.

Composto		Recuperação da Matriz Inerte (%)		Composto		Recuperação da Matriz Inerte (%)	
		Média	Amplitude			Média	Amplitude
16 PAHs USEPA	N	89	76-95	PAHs Adicionais	1-MN	80	59-111
	Acy	92	70-129		2,3,5-MN	77	56-96
	Ace	94	78-106		Dbt	68	48-104
	F	94	74-109		2-MPhe	79	60-99
	Phe	97	82-107		3,6-MPhe	70	47-83
	A	97	79-126		BeP	82	67-88
	Fluo	117	97-133	Grupos Alquilados	Per	75	53-90
	P	119	101-136		C1-N	76	59-98
	BaA	107	90-114		C2-N	74	59-98
	Chr+Tph	110	104-128		C3-N	72	56-96
	BbF	103	94-116		C1-Phe	73	60-82
	BkF	106	94-124		C2-Phe	67	47-80
	B(b+k)F	107	99-118				
	BaP	94	83-101				
	Ind	99	81-110				
	DBA	104	90-120				
	BghiP	109	100-126				

Pela análise da tabela XV verifica-se que o valor médio das recuperações para os 16 compostos da US EPA variou entre 89 e 119%, havendo pontualmente valores de recuperação que não cumpriram os  $\pm 25\%$ . Isto indica que o método é válido para a maioria destes compostos. Em relação às recuperações dos PAHs adicionais e dos grupos alquilados, estes valores foram mais baixos com um valor médio a variar entre 67 e 82%;

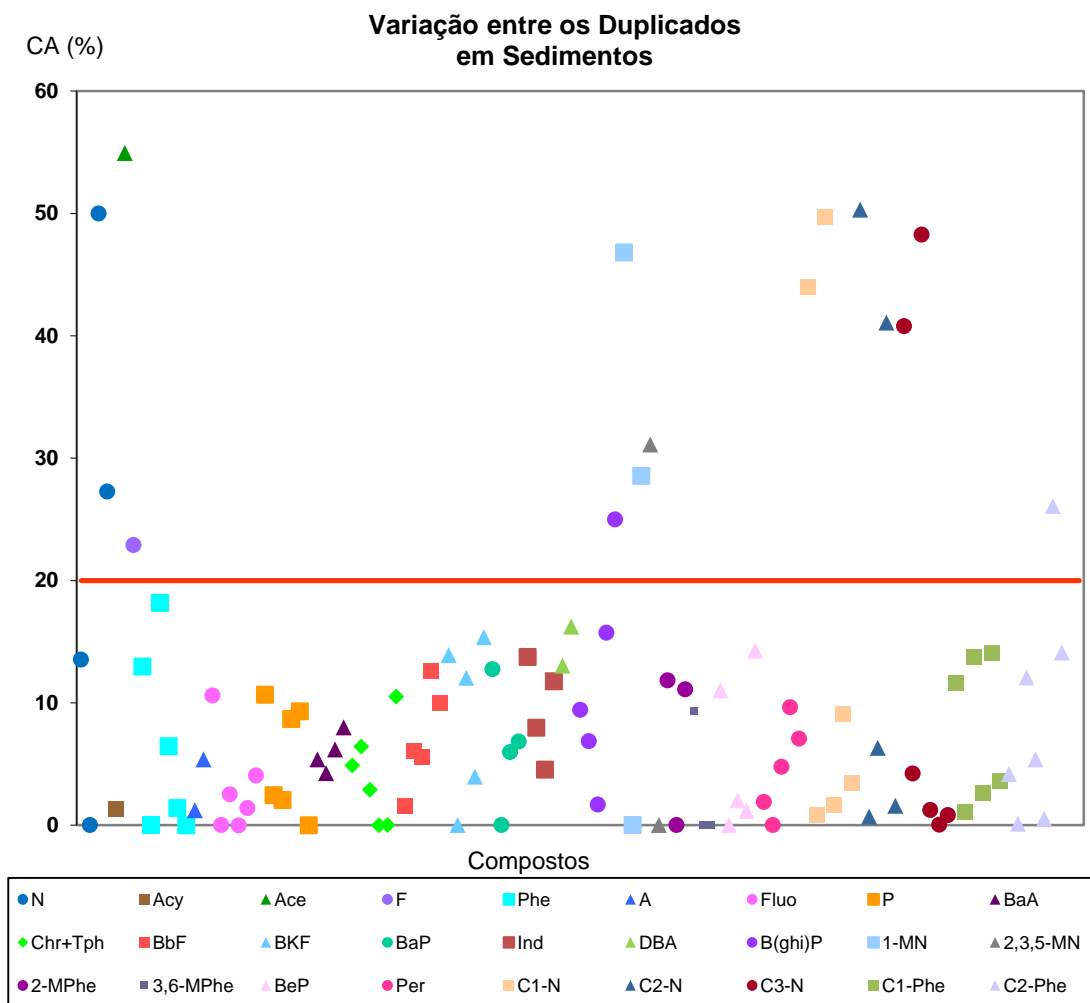
- A recta de calibração, foi aceite tendo em consideração o coeficiente de correlação linear superior ou igual a 0,995, forçando a recta a passar no zero. Quando tal não aconteceu foi desprezado o(s) padrão(s) em causa, tendo em conta que o mínimo de padrões considerados para a elaboração de uma recta de calibração foi 6. Neste estudo foram efectuadas 8 rectas de calibração com 8 padrões desta forma, nos casos em que esse coeficiente não preencheu os critérios foram eliminados sequencialmente até um máximo de 2. Apresenta-se na tabela XVI as equações das rectas e os seus coeficientes de correlação.

**Tabela XVI** - Equações das rectas e os seus coeficientes de correlação.

Recta	Equação	Coeficiente de correlação
1	$0,83759x + 0$	1,000
2	$0,83802x + 0$	0,9999
3	$0,84498x + 0$	0,9999
4	$0,83202x + 0$	0,9999
5	$0,80952x + 0$	0,9993
6	$0,86195x + 0$	0,9999
7	$0,83922x + 0$	0,9991
8	$0,83922x + 0$	0,9991

- Foram efectuados controlos de verificação, que foram analisados logo a seguir à calibração, de modo a permitir garantir que a recta de calibração traçada anteriormente estava válida. No fim da análise de cada lote de amostras foram ainda efectuados controlos de verificação para garantir que não existiu qualquer alteração significativa durante a leitura das amostras e que a recta de calibração continuava a ser aceite;

- Na análise dos duplicados foi considerado como critério de aceitação (CA) uma diferença relativa máxima entre os duplicados de 20% ( $CA \leq 20\%$ ). Para a grande maioria dos duplicados efectuados para as amostras de sedimentos esse critério foi verificado (figura 12).



**Fig. 12** - Variação entre os duplicados, em percentagem, para todos os compostos. Critério de Aceitação ( $CA \leq 20\%$ ).

Através dos resultados (tabela A1 do Apêndice A) verificou-se que para os sedimentos a repetibilidade dos resultados para os 16 compostos da US EPA foi, na sua generalidade, inferior a 15%. Em relação aos compostos adicionais e aos dos grupos alquilados o limite da repetibilidade de 20% só foi aplicável para os compostos 2-MPhe, 3,6-MPhe, BeP, Per e para o grupo dos C1-Phe.

- No âmbito do controlo de qualidade externo, o IH participou de forma consistente desde 1993, nos ensaios interlaboratoriais QUASIMEME (*Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe*). O projecto QUASIMEME realiza a avaliação do desempenho do laboratório, para um dado parâmetro analítico, através de um indicador estatístico (ou parâmetro de desempenho) – Z-score – obtido por comparação entre o valor de concentração reportado pelo laboratório e o valor considerado como verdadeiro. A determinação do valor de Z foi descrita por Cofino & Wells (1994). A avaliação do desempenho do laboratório por recurso a este parâmetro é efectuada de acordo com a seguinte escala de classificação:

$|Z| < 2$  satisfatório;

$2 < |Z| < 3$  questionável;

$|Z| > 3$  não satisfatório.

Na figura 13 apresentam-se os valores de Z-score obtidos pelo IH para alguns dos PAHs analisados a partir do momento em que as extracções passaram a ser feitas por ASE (2012).

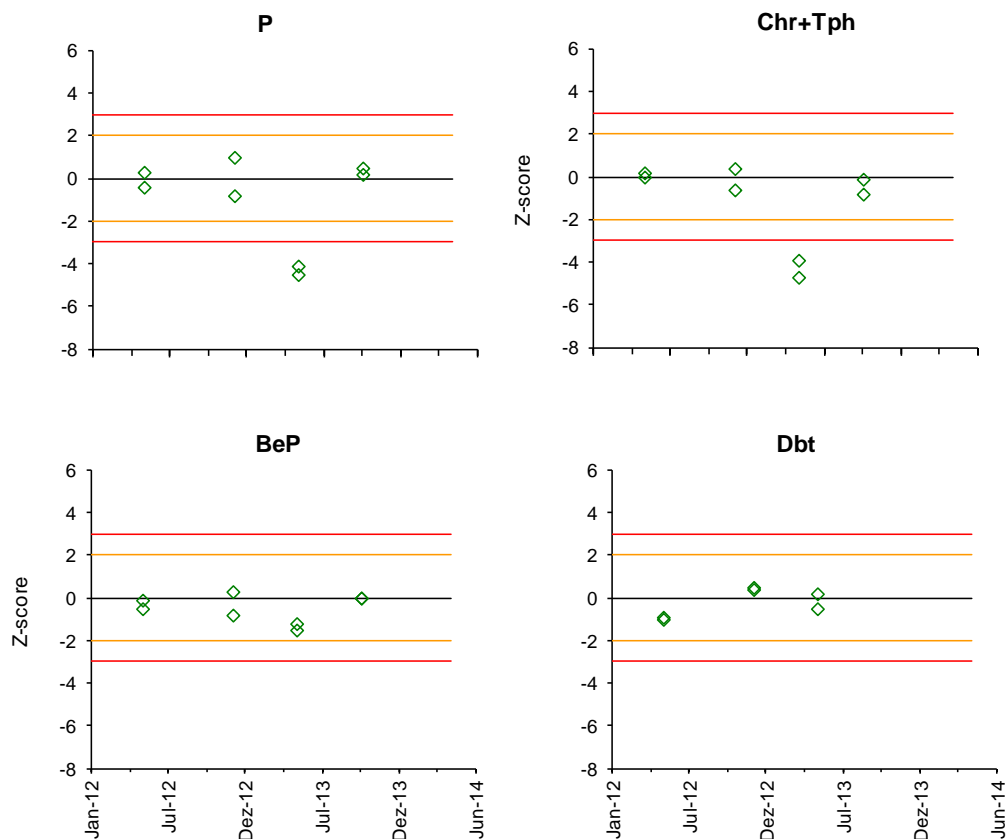


Fig. 13 - Z-score obtidos pelo IH para PAHs a partir de 2012 para o P, Chr+Tph, BeP e Dbt.

Para estes compostos, a avaliação do desempenho do laboratório do IH foi, de um modo geral, satisfatório com excepção dos Z-scores encontrados para o P e Chr+Tph no exercício de Abril de 2013, situação identificada como estando relacionada com a calibração efectuada para os analitos em causa (IH, dados não publicados).

## 2.12 Quantificação das Amostras

- Para os cálculos dos teores em PAHs nas amostras foi necessário ter em conta o valor dos **ensaio em branco**. Foi efectuada sempre a correcção dos valores obtidos para as amostras através da subtração do valor obtido no ensaio em branco, quando o mesmo apresentou valores acima de LQ.



- Para os cálculos da **recuperação** foi utilizada a seguinte equação:

$$\%R = \frac{|X|_{\text{Obtida}}^{\text{Rec}} - |X|_{\text{Obtida}}^{\text{BP}}}{|X|_{\text{Teórica}}} \times 100$$

em que,

**%R** - % de recuperação;

**|X|<sup>Rec ou BP</sup><sub>Obtida</sub>** - concentração do analito X no ensaio de recuperação ou no ensaio do branco do procedimento, obtido pela análise dos cromatogramas;

**|X|<sub>Teórica</sub>** - concentração do analito X que teoricamente existe no extrato do ensaio de recuperação.

- Para a **quantificação das amostras** foi necessário traçar a **recta de calibração** com padrões de concentrações conhecidas do P1 ao P8 (tabela XII). Estes foram sempre injectados a partir do valor mais baixo P1 para o de maior concentração P8. A calibração permitiu a determinação da seguinte relação:

$$\frac{A_X}{A_{PI}} = m \frac{|X|_{\text{ext.}}}{|PI|_{\text{ext.}}}$$

em que,

**A<sub>X</sub> e A<sub>PI</sub>** - área do analito X ou do padrão interno PI nos cromatogramas iónicos respectivos;

**|PI|<sub>ext</sub> (µg mL<sup>-1</sup>)** - concentração do padrão interno PI no extracto sujeito a análise por GC-MSD;

**m** - declive da recta obtido pela calibração;

**|X|<sub>ext</sub> (µg mL<sup>-1</sup>)** - concentração do analito X obtida através da aplicação da recta de calibração respectiva; concentração dada pelo GC-MSD.

- Desta forma foi possível efectuar o cálculo da concentração do analito X para o volume de extracto utilizado, quer nas amostras quer no ensaio em branco através da seguinte equação:

$$|X|_{\text{ext}} (\mu\text{g/mL}) = \frac{\left(\frac{A_X}{A_{PI}}\right)}{m} \times |PI|_{\text{ext}}$$

em que,

$|X|_{\text{ext}} (\mu\text{g mL}^{-1})$  - concentração do analito X no extracto sujeito a análise por GC-MSD.

- De forma a converter a concentração obtida para cada analito para base seca com as devidas correcções foi utilizada a seguinte equação:

$$|X|_{(\mu\text{g/kg bs})} = \frac{(|X|_{\text{ext}}^a - |X|_{\text{ext}}^{\text{BP}}) \times V_f}{m_a} \times \frac{100}{\% \text{Rec}} \times \frac{100}{\% \text{PS}}$$

em que,

$|X| (\mu\text{g kg}^{-1} \text{ bs})$  - concentração do analito X na amostra, com correção relativamente à recuperação em matriz inerte e ao peso seco;

$V_f (\text{mL})$  - volume final da amostra sujeito à análise por GC-MSD, ou seja, sempre 1 mL;

$m_a (\text{kg})$  - massa da amostra em kg.

Rec - recuperação; **nos casos em que a R (%)  $\leq 75\%$  ou R (%)  $\geq 125\%$**  foi necessário proceder à correcção do cálculo de  $|X| (\mu\text{g kg}^{-1} \text{ bs})$  através da introdução do seguinte termo:

$$\frac{100}{\% \text{ REC}}$$

Para além disso, foi sempre efectuada a correcção relativamente ao peso seco através da introdução do seguinte termo:

$$\frac{100}{\% \text{ PS}}$$

## Capítulo III: Tratamento e Análise dos Resultados

### 3.1 Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos para os PAHs foi usada a aplicação informática Microsoft Office Excel 2007.

Foram ainda utilizadas as aplicações informáticas Golden Software Surfer (versão 8) para a elaboração dos gráficos em que estão representadas as estações amostradas e os teores dos diversos PAHs.

Na análise efectuada e para efeitos de cálculo, todos os valores ao nível do LQ foram considerados em metade do seu valor absoluto conforme definido no art. 7º do Decreto-Lei n.º 103/2010. Para efeitos do somatório dos PAHs, os valores ao nível do LQ foram considerados como zero. Depois de convertidos os valores nestas condições foram efectuados os respectivos gráficos.

Nos casos em que foram analisadas amostras das mesmas estações em anos distintos (estações 7, 8 e 9), a letra A representa as amostras recolhidas no ano de 2010 e a letra B representa as amostras recolhidas no ano de 2011. Nos gráficos de representação espacial foi considerado o valor médio para as estações 7, 8 e 9.

### 3.2 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em Sedimentos

Para os sedimentos os resultados são abordados e discutidos relativamente ao somatório dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA, ao somatório dos PAHs considerados com potencial carcinogénico, aos PAHs individuais, aos 7 PAHs adicionais, aos homólogos alquilados do naftaleno e do fenantreno, à toxicidade, à comparação com os critérios de avaliação de *background*, aos factores equivalentes de benzo(a)pireno (EBaP), aos quocientes médios de risco e aos guias de qualidade.

Na tabela B1 do Apêndice B são apresentados os teores determinados para os PAHs em sedimento.

#### 3.2.1 Somatório dos 16 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos da US EPA

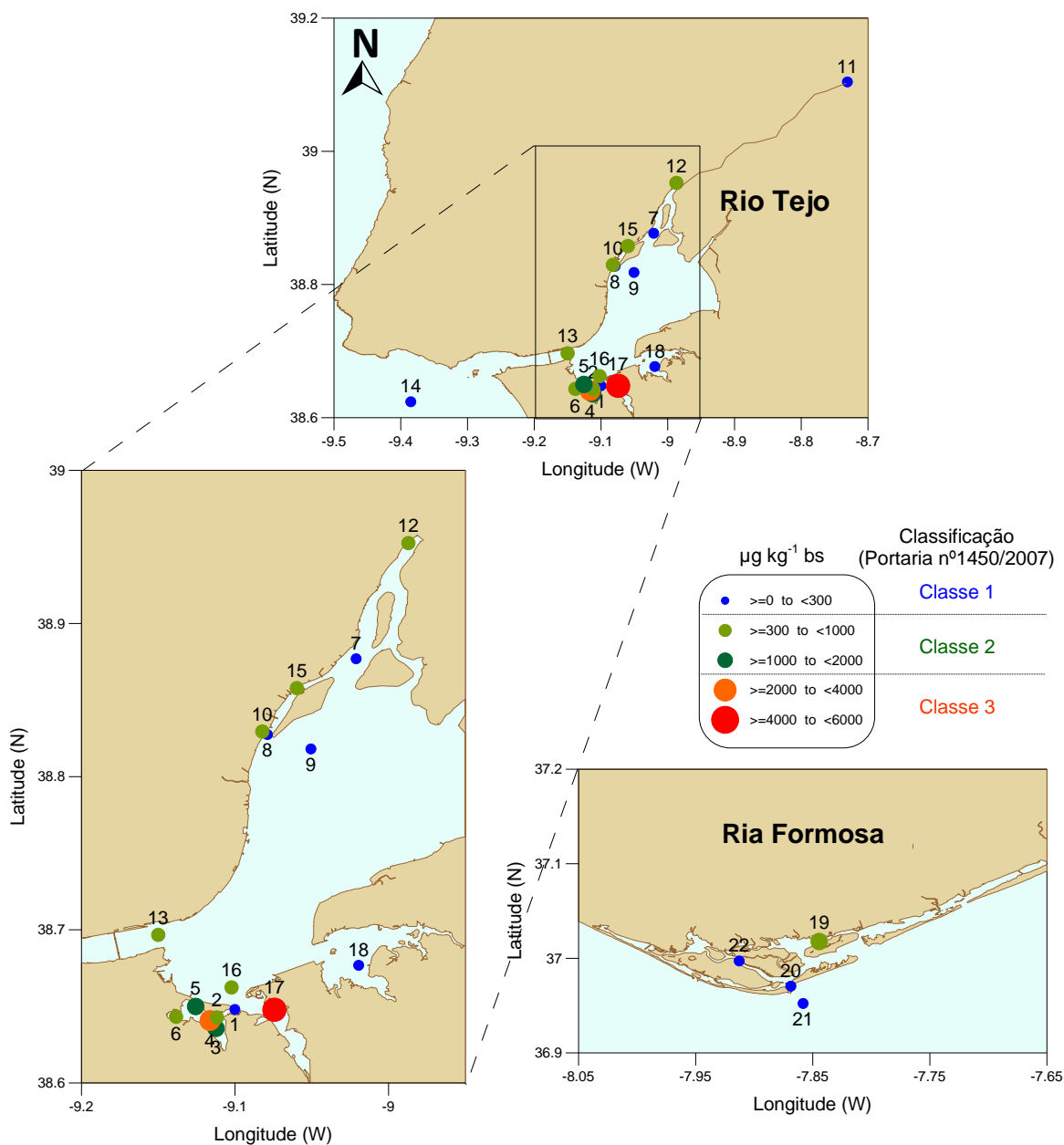
Os resultados da soma dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA obtidos para os sedimentos estão representados e discutidos com base na classificação dos dragados de acordo com a Portaria 1450/2007 de 12 de Novembro. Esta Portaria é

específica para dragados, o que não foi o caso. No entanto, esta análise foi efectuada de uma forma ponderada, tendo desta forma um carácter indicativo.

A Portaria 1450/2007 de 12 de Novembro define valores para o somatório mas não faz referência aos PAHs a considerar, no entanto permite a distinção dos dragados por classes de qualidade, associadas à seguinte forma de eliminação dos materiais dragados:

- **Classe 1 ( $<300 \mu\text{g kg}^{-1}$ )** - Material dragado limpo - pode ser depositado no meio aquático ou repouso em locais sujeitos a erosão ou utilizado para alimentação de praias sem normas restritivas.
- **Classe 2 ( $300\text{-}2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ )** - Material dragado com contaminação vestigiária - pode ser imerso no meio aquático tendo em atenção as características do meio receptor e o uso legítimo do mesmo.
- **Classe 3 ( $2000\text{-}6000 \mu\text{g kg}^{-1}$ )** - Material dragado ligeiramente contaminado - pode ser utilizado para terraplenos ou no caso de imersão necessita de estudo aprofundado do local de deposição e monitorização posterior do mesmo.
- **Classe 4 ( $6000\text{-}20000 \mu\text{g kg}^{-1}$ )** - Material dragado contaminado - preposição em terra, em local impermeabilizado, com a recomendação de posterior cobertura de solos impermeáveis.
- **Classe 5 ( $>20000 \mu\text{g kg}^{-1}$ )** - Material muito contaminado - idealmente não deverá ser dragado e em caso imperativo, deverão os dragados ser encaminhados para tratamento prévio e ou deposição em aterro de resíduos devidamente autorizado, sendo proibida a sua imersão.

A distribuição espacial do somatório dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA para o Estuário do rio Tejo e para a Ria Formosa encontram-se representadas na figura 14.



**Fig. 14 -** Distribuição espacial do somatório dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA para as amostras de sedimento nas estações analisadas de acordo com a Portaria 1450/2007 de 12 de Novembro.

De acordo com a figura 14 a grande maioria dos sedimentos recolhidos no Estuário do rio Tejo e a totalidade dos sedimentos recolhidos na Ria Formosa pertencem à classe 1 e 2, classificadas como material dragado limpo e material dragado com contaminação vestigiária, respectivamente. As únicas estações em que se verificou que o material dragado estava ligeiramente contaminado (classe 3) foram registadas no Estuário do rio Tejo para a estação 4 (baía do Seixal) e 17 (esteiro de Coína).

Quando comparamos os resultados obtidos do somatório dos 16 PAHs da US EPA verificamos que as amostras localizadas nas estações do Estuário do rio Tejo, que variaram entre 9,2 e 5445  $\mu\text{g kg}^{-1}$  bs, registaram valores mais elevados do que os registados para a Ria Formosa onde os teores variaram entre 5,6 e 650  $\mu\text{g kg}^{-1}$  bs.

Comparando os valores obtidos para o somatório dos 16 PAHs da US EPA da estação 7 com o valor obtido para a estação B1 (estação mais próxima a nível geográfico) por Serafim *et al.* (2013) verifica-se que o teor médio das amostras da estação 7 é cerca de 5 vezes inferior ao reportado por estes autores. A diferença observada pode ser causada pela localização da estação 7 numa área com maior dinâmica relativamente à estação B1 que parece localizada mais na margem e consequentemente mais confinada e mais sujeita a acções antropogénicas. Por outro lado, relativamente ao conteúdo em matéria orgânica, a estação B1 foi caracterizada pelos mesmos autores como tendo  $9,73 \pm 0,18\%$  enquanto para a estação 7 estes valores foram inferiores a 0,4% (Cruz 2011; Cruz & Valença 2012). Existe ainda outro factor que poderá justificar esta diferença, uma vez que a fracção  $<63 \mu\text{m}$  registada para B1 é de  $99,29 \pm 0,28\%$  enquanto para a estação 7 esse valor foi de apenas 3,77%.

No entanto, à semelhança de Serafim *et al.* (2013), onde foram analisados vários estuários, também os valores mais elevados foram registados para o Estuário do rio Tejo.

### 3.2.2 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos com Potencial Carcinogénico

Dentro do grupo dos PAHs, existem alguns em particular que são considerados com potencial carcinogénico (BaA, Chr, BbF, BkF, BaP, Ind e DBA), (Qiao *et al.*, 2006; Savinov *et al.*, 2003; Nadal *et al.*, 2004), assim sendo foi analisado o somatório dos PAHs carcinogénicos ( $\Sigma\text{CPAHs}$ ).

Os resultados obtidos para o somatório dos PAHs considerados com potencial carcinogénico (BaA, Chr+Tph, B(b+k)F, BaP, Ind e DBA) encontram-se representados na figura 15.

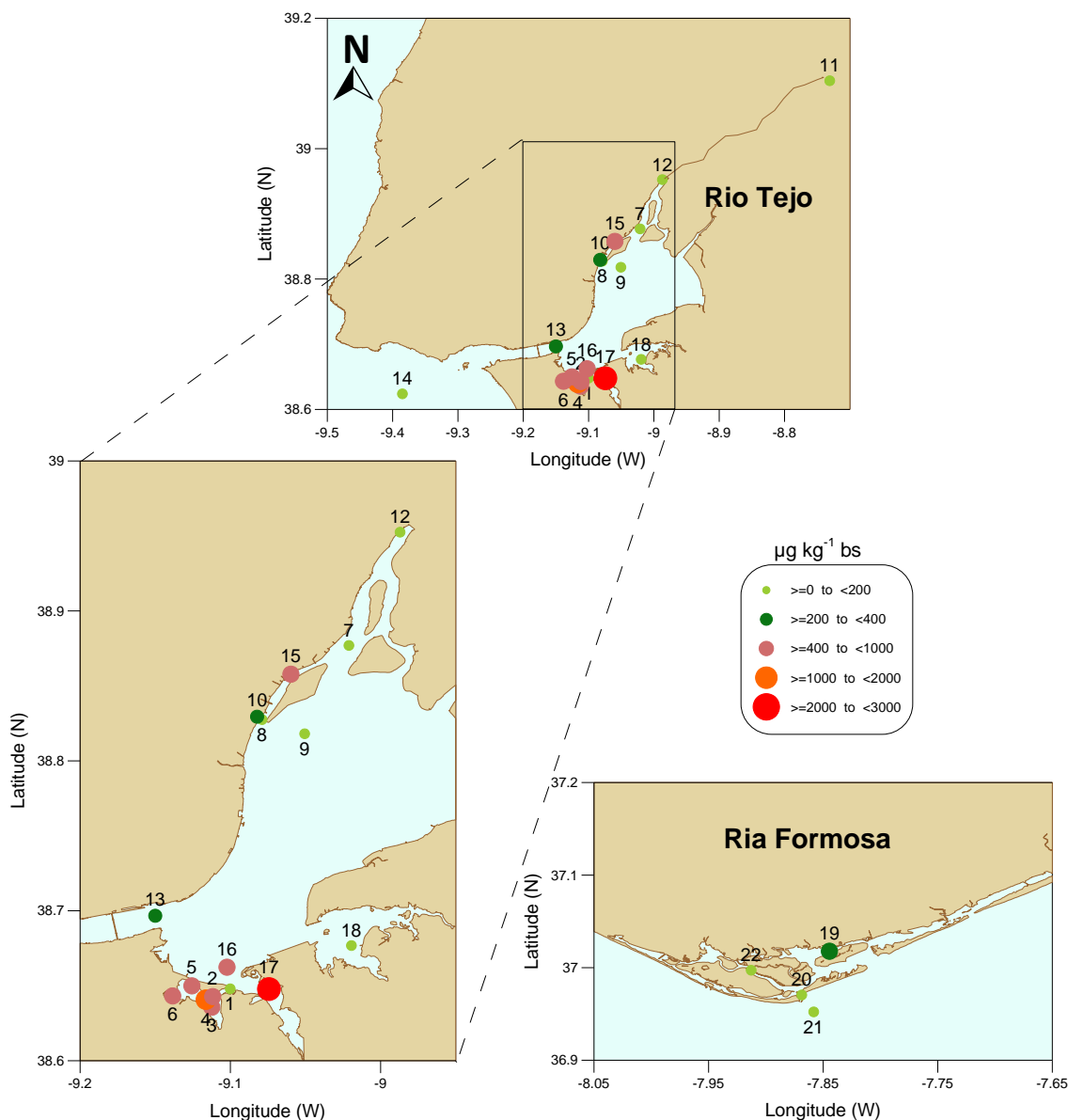


Fig. 15 - Distribuição espacial do somatório dos PAHs com potencial carcinogénico para as amostras de sedimento.

De acordo com a figura 15 a grande maioria dos sedimentos recolhidos no Estuário do rio Tejo e a totalidade dos sedimentos recolhidos na Ria Formosa possuem uma totalidade de PAHs considerados cancerígenos até um valor de 1000 µg kg<sup>-1</sup> bs. Os valores mais elevados, à semelhança do que se verificou para o somatório dos 16 PAHs da US EPA, foram registados nas estações 4 (1387 µg kg<sup>-1</sup> bs) e 17 (2689 µg kg<sup>-1</sup> bs), localizadas no Estuário do rio Tejo.

Quando comparamos os resultados obtidos do  $\sum$ CPAHs para as amostras do Estuário do rio Tejo com os da Ria Formosa verificamos que as estações localizadas no Estuário

do rio Tejo, variaram entre 3 e 2689  $\mu\text{g kg}^{-1}$  bs, sendo estes valores superiores aos registados para a Ria Formosa onde os teores variaram entre 2 e 361  $\mu\text{g kg}^{-1}$  bs.

### 3.2.3 Análise dos compostos individuais dos Sedimentos

A análise individual dos PAHs permite verificar a existência de algum composto que esteja sobrelevado ou sub-elevado em cada estação. Para além disso, permite verificar se existe algum PAH que se encontre em maior ou menor percentagem em todas as estações. Para além disso, a distribuição dos PAHs a nível individual permite distinguir os hidrocarbonetos relativamente à sua origem: se petrogénicos ou pirogénicos.

#### 3.2.3.1 Análise dos 16 compostos da US EPA

Na figura 16 estão representados os resultados obtidos para cada um dos 16 PAHs da US EPA analisado em cada uma das estações estando assinalados em tons de rosa, laranja e vermelho os PAHs com potencial carcinogénico. Dos PAHs com potencial carcinogénico, isto é, em que foi demonstrada uma forte associação entre a sua administração e o desenvolvimento de um tipo de cancro específico, cancro que tem origem num tecido epitelial (carcinoma), o BaP é o mais estudado (Ramírez *et al.*, 2011).



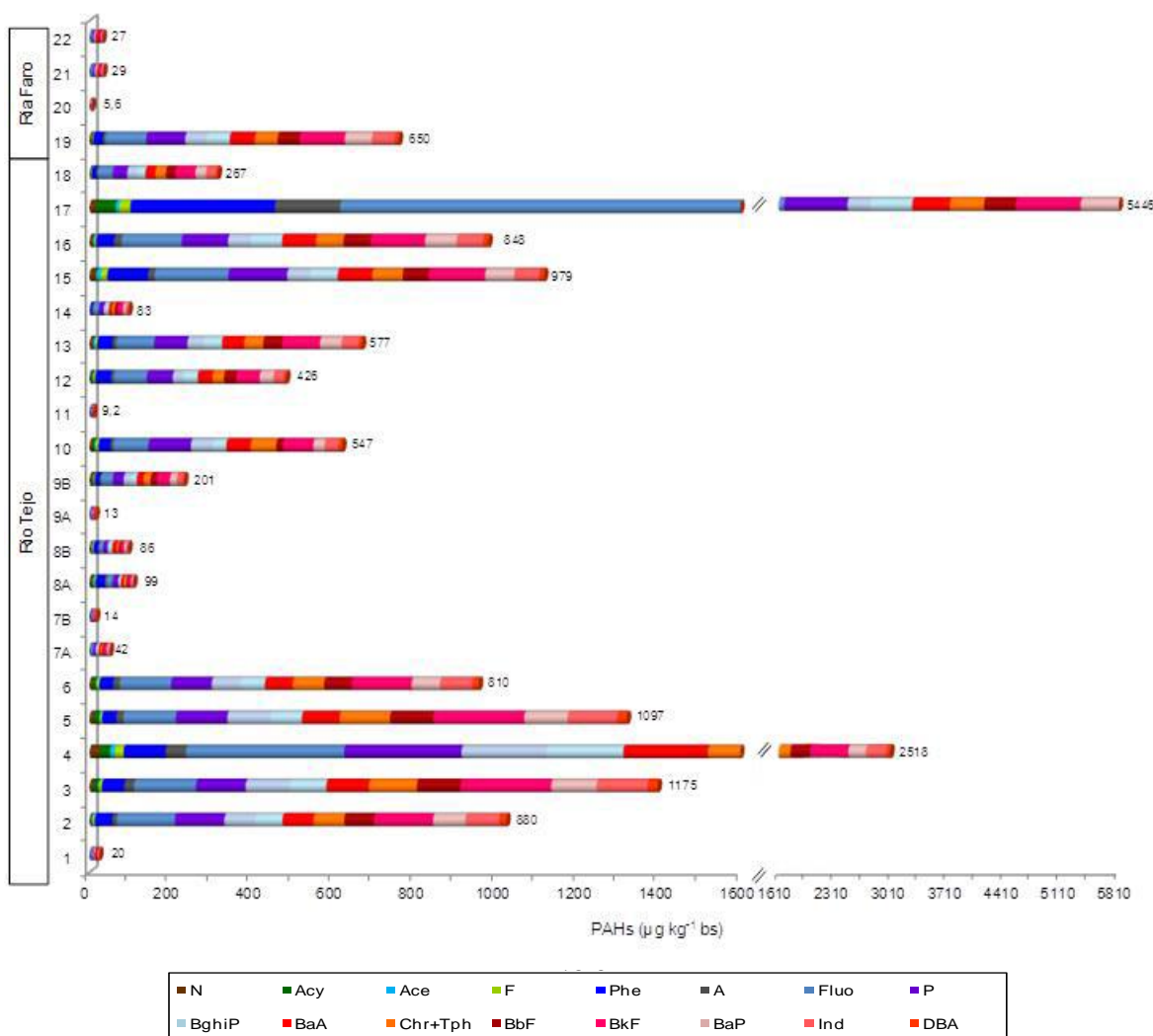


Fig. 16 - Concentração dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA para as amostras de sedimento nas estações analisadas, em que os PAHs com potencial carcinogénico estão representados em tons de rosa, laranja e vermelho.

A análise dos PAHs individuais permite verificar que o composto com teores mais elevados, ou seja, em que o somatório das suas concentrações na totalidade das amostras é mais elevado foi registado para o Fluoranteno (Fluo), em que o valor obtido foi igual a  $2824 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bs}$ , seguido do Pireno (P), em que este valor foi de  $2265 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bs}$ . Em oposição, foi verificado que o composto com teores mais baixos foi registado para o Acenafeno (Ace), em que o valor obtido foi igual a  $61 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bs}$ .

É interessante verificar que, por exemplo, para a estação 17 apesar do valor de  $\sum_{16}\text{PAHs}$  ser bastante elevado ( $5445 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bs}$ ), a percentagem de CPAHs é de apenas 49%. Em contraste encontra-se a estação 5, em que o valor de  $\sum_{16}\text{PAHs}$  é de  $1097 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bs}$  e a percentagem de CPAHs é de 59%.

Em relação à percentagem de PAHs carcinogénicos, isto é dentro dos 16 PAHs da US EPA, os valores obtidos para as amostras do Estuário do rio Tejo não variaram muito, de 26 a 59%. Para a Ria Formosa essa percentagem variou de 38 a 58%.

A fonte petrogénica e pirogénica do PAH também já foi distinguida através da utilização da razão entre hidrocarbonetos de baixa densidade (LMW) e hidrocarbonetos de alta densidade (HMW) de acordo com Wise *et al.* (1988). Os LMW são os hidrocarbonetos que possuem 2-4 anéis enquanto os HMW são os hidrocarbonetos constituídos por 5-6 anéis.

Razões > 1 habitualmente indicam fontes petrogénicas;

Razões < 1 indicam fontes pirogénicas.

No presente estudo a razão LMW/HMW, para as estações 7B, 8A, 8B, 9A, 10, 11, 12, 15, 17 situadas no Estuário do rio Tejo e para a estação 20 na Ria Formosa, é superior a 1 o que indica que a origem destes hidrocarbonetos é petrogénica.

### 3.2.3.2 Análise dos Compostos Adicionais

Dentro do grupo dos PAHs analisados durante este trabalho, para além dos 16 considerados prioritários pela US EPA foram ainda analisados 7 PAHs que foram designados de adicionais (figura 17). Estes PAHs são: 1-metilnaftaleno (1-MN); 2,3,5-trimetilnaftaleno (2,3,5-MN); dibenzotiofeno (Dbt); 2-metilfenantreno (2-MPhe); 3,6-dimetilfenantreno (3,6-MPhe); benzo(e)pireno (BeP) e perileno (Per).

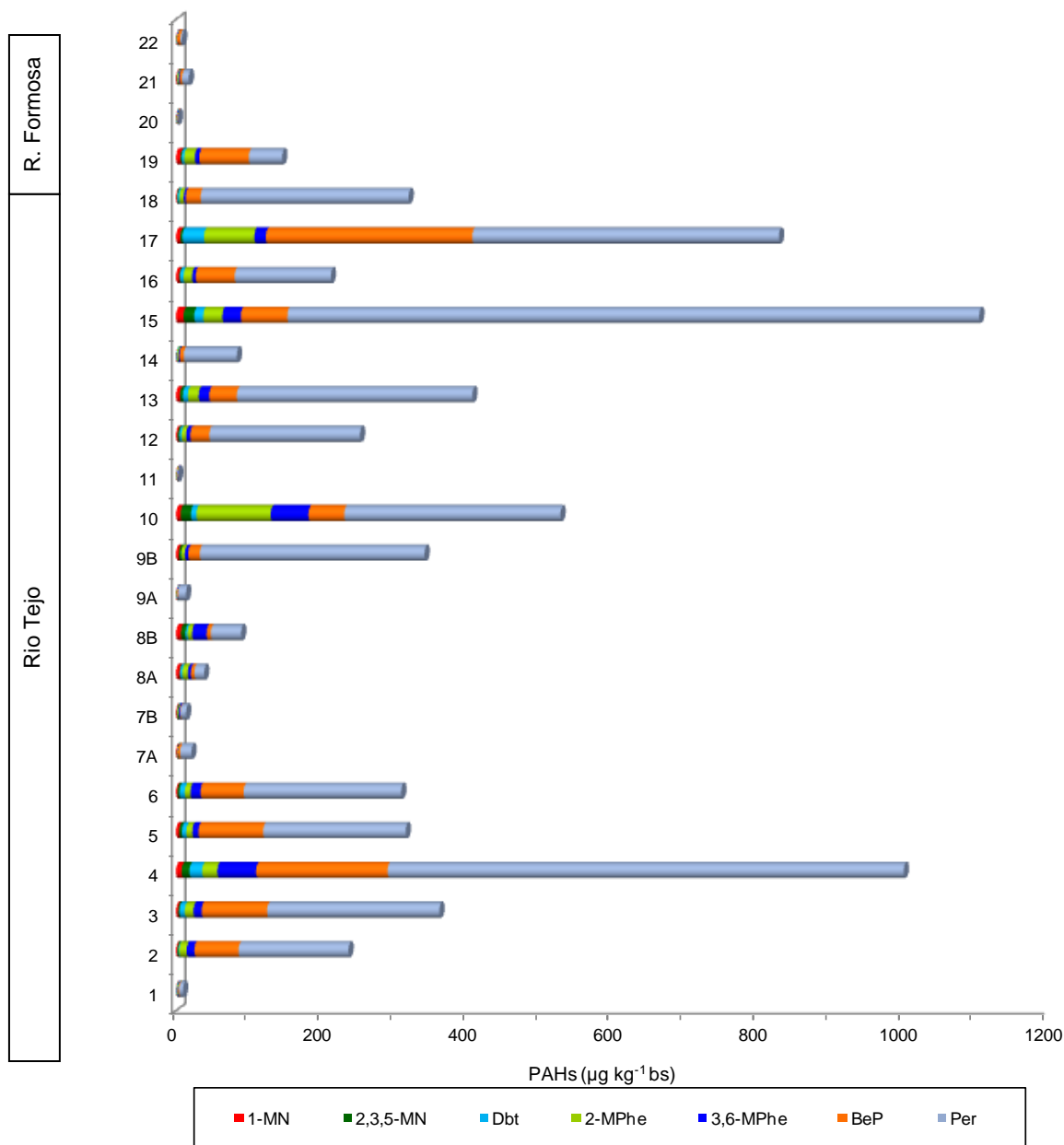


Fig. 17 - Concentração em sedimento dos 7 PAHs designados de adicionais: 1-metilnaftaleno (1-MN); 2,3,5- metilnaftaleno (2,3,5-MN); dibenzotiofeno (Dbt); 2-metilfenantreno (2-MPhe); 3,6- metilfenantreno (3,6-MPhe); benzo(e)pireno (BeP) e perileno (Per).

Na grande maioria das amostras de sedimentos analisadas pode afirmar-se que a concentração mais elevada dentro deste grupo de PAHs adicionais foi registada para o Per, seguida do BeP. Na estação 15 foi registado o valor mais elevado de concentração

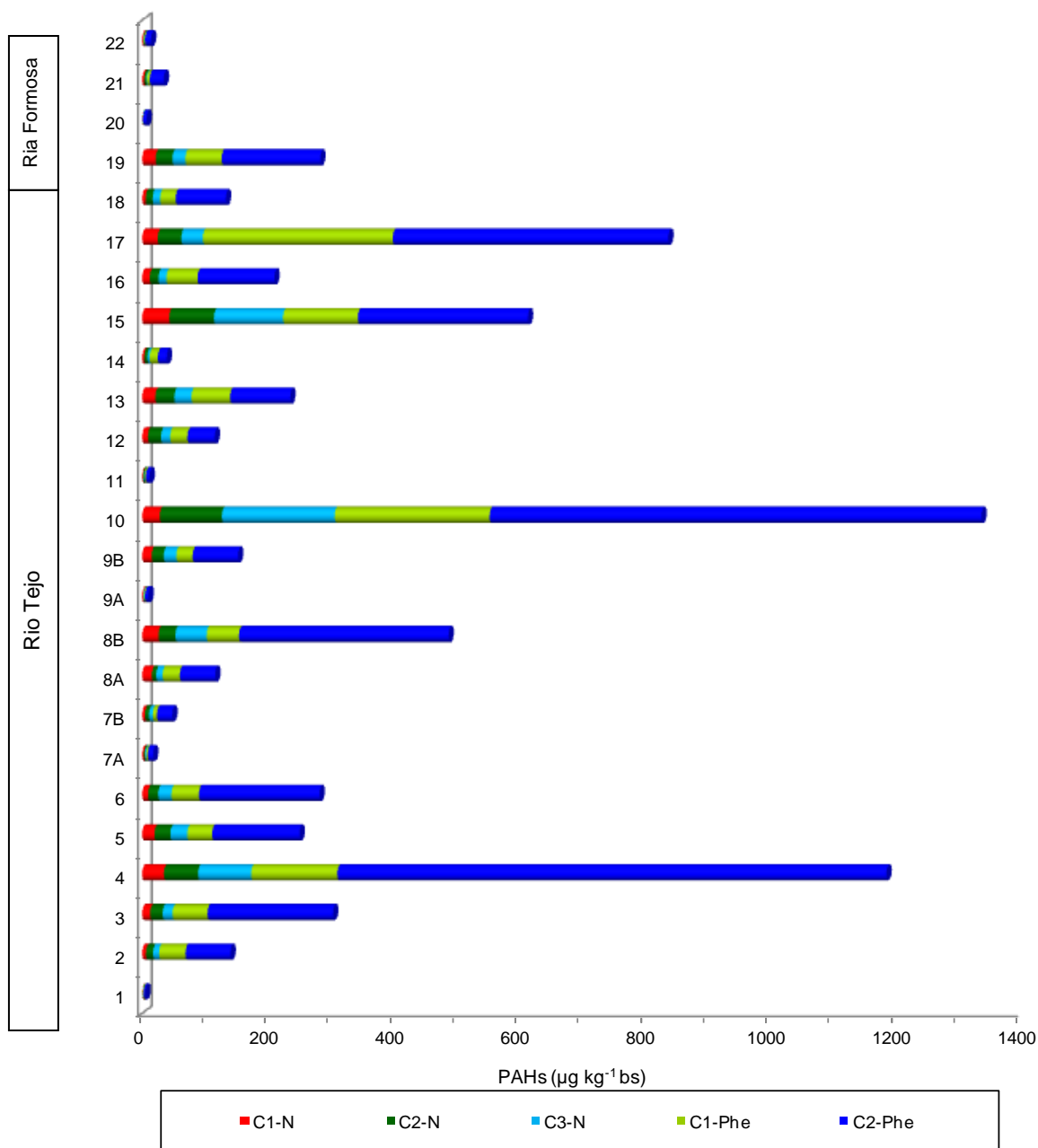
para o Per que foi de  $952 \mu\text{g kg}^{-1}$  bs, correspondendo a 86% da totalidade dos PAHs adicionais analisados para esta estação.

Poucos PAHs podem ser produzidos por processos naturais, embora a evidência para síntese biológica *de novo* seja baixa. O Per também pode ser produzido em sedimentos a partir dos pigmentos das plantas sob condições específicas e foi demonstrado que este composto dominava o perfil de PAHs em secções de *core* depositados antes de 1890 em Esthwaite Water (UK), em que a maior entrada de PAHs era de fonte atmosférica (Sanders *et al.*, 1993). O Per também surge de fontes de combustão e de petróleo, e em sedimentos em Puget Sound (USA) foi demonstrado que derivava da erosão a partir de fonte natural terrestre (Barrick & Prahl, 1987).

### 3.2.3.3 Análise dos Grupos Homólogos Alquilados do Naftaleno e do Fenantreno

Foram ainda analisados durante este trabalho, os grupos de séries homólogas alquiladas do naftaleno (C1, C2 e C3-N) e do fenantreno (C1, C2-Phe). Em que C1-N representa o grupo dos metilnaftalenos; C2-N o grupo dos dimetilnaftalenos; C3-N o grupo dos trimetilnaftalenos; C1-Phe o grupo dos metilfenantrenos e C2-Phe o grupo dos dimetilfenantrenos.

Na figura 18 apresentam-se os valores obtidos para as concentrações dos homólogos alquilados do naftaleno e do fenantreno.



**Fig. 18** - Concentração em sedimento dos PAHs homólogos alquilados do naftaleno (C1, C2 e C3-N) e do fenantreno (C1, C2-Phe).

Pela análise da figura 18 é de salientar que os teores mais elevados foram obtidos para a estação 10, situada na vala de drenagem em S. João da Talha, sobretudo para o grupo C2-Phe, em que foram registados os valores de  $783 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bs}$ .

Comparando as razões de C1-N e C2-N com C1-Phe e C2-Phe respectivamente, verifica-se que para a totalidade das amostras o grupo de Phe é o que tem os teores mais

elevados, o que se encontra de acordo com Yang (2000) e Magi *et al.* (2002) devido ao facto de o fenantreno ser termodinamicamente mais estável em relação ao naftaleno.

Os PAHs alquilados, como os metilfenantrenos, são utilizados como indicadores de introdução de petróleo e derivados. A razão entre  $C_0 - \text{Phe} / \sum(C_0 + C_1) \text{ Phe}$  tem sido empregue no diagnóstico de fontes. Esta razão está associada à concentração do fenantreno ( $C_0$ ) com a soma das concentrações dos metilfenantrenos ( $C_1$ ) e o respectivo isómero não-alkilado (fenantreno). Considerando que a fonte prioritária dos metilfenantrenos seja o petróleo e que o fenantreno é associado à combustão, os menores valores desta razão sugerem fontes petrogénicas enquanto os maiores valores apontam para processos de combustão. Os valores inferiores a 0,5 são associados com fontes petrogénicas, sendo que valores compreendidos entre 0,4 e 0,5 sugerem a combustão de derivados de petróleo, os valores superiores a 0,5 são associados à combustão de madeira (biomassa) e carvão (Yunker *et al.*, 2002).

Na maioria das amostras esta razão foi inferior a 0,5, o que indica que estes hidrocarbonetos podem estar associados a fontes petrogénicas. Apenas duas amostras (9B e 12) registaram valores desta razão superiores a 0,5, podendo estes hidrocarbonetos estarem associados à combustão de madeira (biomassa) e carvão de acordo com Yunker *et al.* (2002).

### 3.2.3.4 Sumário da Análise dos compostos no sedimento

A maioria dos sedimentos foram classificados como material dragado limpo e material dragado com contaminação vestigiária (classe 1 e 2), com excepção das estações 4 e 17 que se classificam como material dragado ligeiramente contaminado (classe 3).

Em relação aos resultados obtidos para  $\sum\text{CPAHs}$  para as amostras localizadas no Estuário do rio Tejo, verifica-se que os teores máximos encontrados são cerca de dez vezes superiores aos encontrados na Ria Formosa. Este mesmo comportamento é observado quando se comparam os resultados de  $\sum 16\text{PAHs}$ .

Uma forma de avaliar a contribuição biogénica associada a fontes de PAHs em ambientes aquáticos é através da distribuição do perileno (Per). Na maioria das estações as concentrações de perileno foram acima de 10% do total dos homólogos de 5 anéis (BbF + BkF + BaP + DBA + BeP + Per), o que significa de acordo com Baumard *et al.* (1998) que podem indicar uma introdução de fontes diagenéticas. Esta condição só não

foi verificada para as estações situadas na baía do Seixal (3, 4, 5, 6) e para as estações 7 e 8 colhidas no ano de 2010.

O grupo dos alquilados do Phe é o que tem os teores mais elevados em comparação com os obtidos para o naftaleno, parecendo indicar que os 3 anéis do fenantreno são mais susceptíveis a metilação relativamente aos 2 anéis que constituem o naftaleno. Na maioria das amostras a origem destes hidrocarbonetos podem estar associados a fontes petrogénicas (Yunker *et al.*, 2002).

### 3.3 Toxicidade em Sedimentos

Com o intuito de poder classificar os sedimentos de acordo com o seu estado ecológico foram desenvolvidos por diversos autores Guias de Qualidade para o Sedimento (SQGs).

Para a verificação do impacto causado pela presença destes poluentes, foram considerados dois critérios interpretativos para avaliar a qualidade dos sedimentos com relação aos poluentes químicos. Um desses critérios foi estabelecido em legislação do Canadá (MacDonald *et al.*, 1996), o qual definiu dois limites e três faixas para sedimentos de águas salobras e salinas: o **TEL** (*Threshold Effect Level*), que indica o nível abaixo do qual não ocorre efeito adverso à comunidade biológica; e o **PEL** (*Probable Effect Level*), que é o nível acima do qual é provável a ocorrência de efeito adverso à comunidade biológica e a faixa entre o **TEL** e o **PEL** representa uma possível ocorrência de efeito adverso à comunidade biológica. O outro é o critério americano estabelecido por Long *et al.* (1995) que utilizou dados químicos e biológicos e realizou estudos de campo em sedimentos marinhos e estuarinos, definindo dois limites e três faixas para definir a qualidade dos sedimentos: o **ERL** (*effects range - low*), que indica o limite de concentração abaixo do qual os sedimentos raramente são tóxicos; o **ERM** (*effects range - medium*), indica que os sedimentos provavelmente são tóxicos, quando algum elemento (neste caso específico, quando algum PAH) passa esse valor e a faixa maior que o **ERL** e menor que o **ERM** indica que os sedimentos possivelmente são tóxicos. Esses limites foram obtidos a partir de resultados que combinam as concentrações de metais e PAHs em sedimentos e os respetivos efeitos biológicos adversos. A análise através do uso destes critérios permite a identificação dos contaminantes em concentrações tóxicas em sedimento e biota.

Em toda a avaliação de riscos para o ecossistema para além da toxicidade individual, ou seja, o efeito negativo provocado pela presença de uma determinada substância ingerida, inalada ou absorvida, em concentrações acima de um determinado limite é essencial conhecer a sua toxicidade tendo em conta outros compostos presentes. A toxicidade individual é certamente alterada tendo em conta outros compostos presentes, que poderão simplesmente alterar a sua espécie química e tornar esse composto extremamente tóxico, como o caso do mercúrio (Rocha, 2013).

Assim sendo, na avaliação de riscos para o ecossistema deve-se ainda ter em conta a toxicidade de outros compostos presentes na mesma matriz como metais pesados (As, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb e Zn) e outros compostos orgânicos.

### 3.3.1 Comparação com os Critérios de Avaliação de Background

Outra das abordagens possíveis para a avaliação do nível de contaminação dos sedimentos por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) é a comparação das respectivas concentrações com valores de referência tabelados.

Com o objectivo de avaliar alterações no meio marinho tendo em conta valores anteriores (*background*), a OSPAR desenvolveu as Concentrações de *Background* (BCs) baseado em dados contemporâneos ou históricos” (OSPAR Agreement 2005-6). Para substâncias que ocorrem de forma natural, BCs são concentrações típicas encontradas em locais sem contaminação na área marítima OSPAR (*North-East Atlantic*). Para substâncias de origem antropogénica, a OSPAR assumiu BC igual a zero. De modo a facilitar as avaliações, a OSPAR desenvolveu os Critérios de Avaliação de *Background* (BACs).

De modo a efectuar esta comparação, as concentrações de PAHs são normalizadas para 2,5% de carbono orgânico e comparadas com os Critérios de Avaliação de *Background* (BACs) estabelecidos pela OSPAR (2009).

Na tabela XVII apresentam-se os valores tabelados para os PAHs segundo OSPAR (2009), estando representados a cheio (●) os compostos que ultrapassaram os valores de BACs. Para a avaliação aqui efectuada, foram utilizados os valores de TOC publicados (Silva *et al*, 2011; Cruz, 2011; Cruz & Valença, 2012 e dados não publicados).



Tabela XVII - Comparação dos teores dos PAHs analisados com os Critérios de Avaliação de *Background* (OSPAR, 2009).

	BACs*	N 8	Phe 32	A 5	Fluo 39	P 24	Chr+Tph 20	BaP 30	Ind 103	BghiP 80
Rio Tejo	Baía do Seixal	1	•	•	•	•	•	•	o	•
		2	•	•	•	•	•	•	•	•
		3	•	•	•	•	•	•	•	•
		4	•	•	•	•	•	•	•	•
		5	•	•	•	•	•	•	•	•
		6	•	•	•	•	•	•	o	•
	Estuário	7A	•	o	o	•	•	•	o	o
		7B	•	o	o	•	o	o	o	o
		8A	•	•	•	•	o	o	o	o
		8B	•	•	•	•	•	o	o	o
		9A	o	o	o	o	o	o	o	o
		9B	•	o	o	•	•	o	o	o
		10	•	•	•	•	•	•	o	o
		11	o	o	o	o	o	o	o	o
		12	•	•	•	•	•	•	•	•
		13	•	•	•	•	•	•	o	•
		14	•	o	•	•	•	•	o	o
		15	•	•	•	•	•	•	o	o
		16	•	•	•	•	•	•	•	•
		17	•	•	•	•	•	•	•	•
		18	o	o	•	•	•	•	o	o
Ria Formosa		19	•	•	•	•	•	•	•	•
		20	o	o	o	o	o	o	o	o
		21	o	o	o	o	o	o	o	o
		22	o	o	o	•	•	•	o	o

\* OSPAR 2009; o - teor não ultrapassado; • teor ultrapassado

Nas amostras recolhidas na baía do Seixal observa-se que a grande maioria ultrapassa os teores tabelados para os BACs para todos os compostos, sendo exceção apenas os BACs encontrados nas estações 1 e 6 para o Indeno (1,2,3-c,d) pireno. Nas estações situadas no Estuário do rio Tejo existe uma tendência para serem excedidos os BACs para todos os compostos, sendo exceção a estação situada mais a montante (estação 11) e a estação situada perto do Mouchão da Póvoa (estação 9A e 9B).

Em relação à Ria Formosa, nas zonas com maior dinâmica (estações 20 e 21), nenhum valor superou o valor do BACs. Na estação situada no canal de Olhão (estação 19) todos os compostos excedem os BACs.

Apesar de apenas as estações 9A, 11, 20 e 21, e única e exclusivamente no que se refere aos teores em PAHs, terem registado valores que indicam condições naturais, pristinas, porque não ultrapassam os BACs em nenhum dos hidrocarbonetos tabelados, não se pode afirmar que tal se verifique uma vez que a análise efectuada não considera outros factores essenciais como a análise de outros poluentes como metais pesados ou pesticidas.

### 3.3.2 Factores Equivalentes de Benzo(a)pireno para o sedimento

O Benzo(a)pireno (BaP) é um contaminante ambiental formado durante a combustão incompleta ou pirólise de material orgânico e o seu papel como um potente agente mutagénico e carcinogénico encontra-se bem documentado, estando identificado (IARC, 2012) como um carcinogénico humano. O mecanismo mais fortemente defendido entre a comunidade científica para o desencadeamento carcinogénico induzido pelo BaP envolve a activação metabólica do BaP e subsequente interação dos seus metabolitos com o DNA, levando a mutações em genes supressores tumorais ou oncogenes (IARC, 2012).

Desta forma, o Benzo(a)pireno é utilizado como substância de referência para a apreciação global da exposição aos PAHs. De acordo com este facto foram definidos os factores Equivalentes de Benzo(a)pireno (EBaP: BaA, Chr, BbF, BkF, BaP, DBA e Ind) que resultam do somatório dos produtos das concentrações de cada PAH com evidência cancerígena/mutagénica e os respectivos Factores de Equivalência de Toxicidade (TEF<sub>i</sub>) (Arias *et al.*, 2010):

#### **Cálculo dos factores equivalentes EBaP:**

Concentração Equivalente de BaP (EBaP) = TEF<sub>i</sub> x [PAH<sub>i</sub>]

Concentração Total de EBaP =  $\sum_i \text{EBaP}$

Na figura 19 apresentam-se os valores obtidos para as concentrações totais de EBaP ( $\sum_i \text{EBaP}$ ):

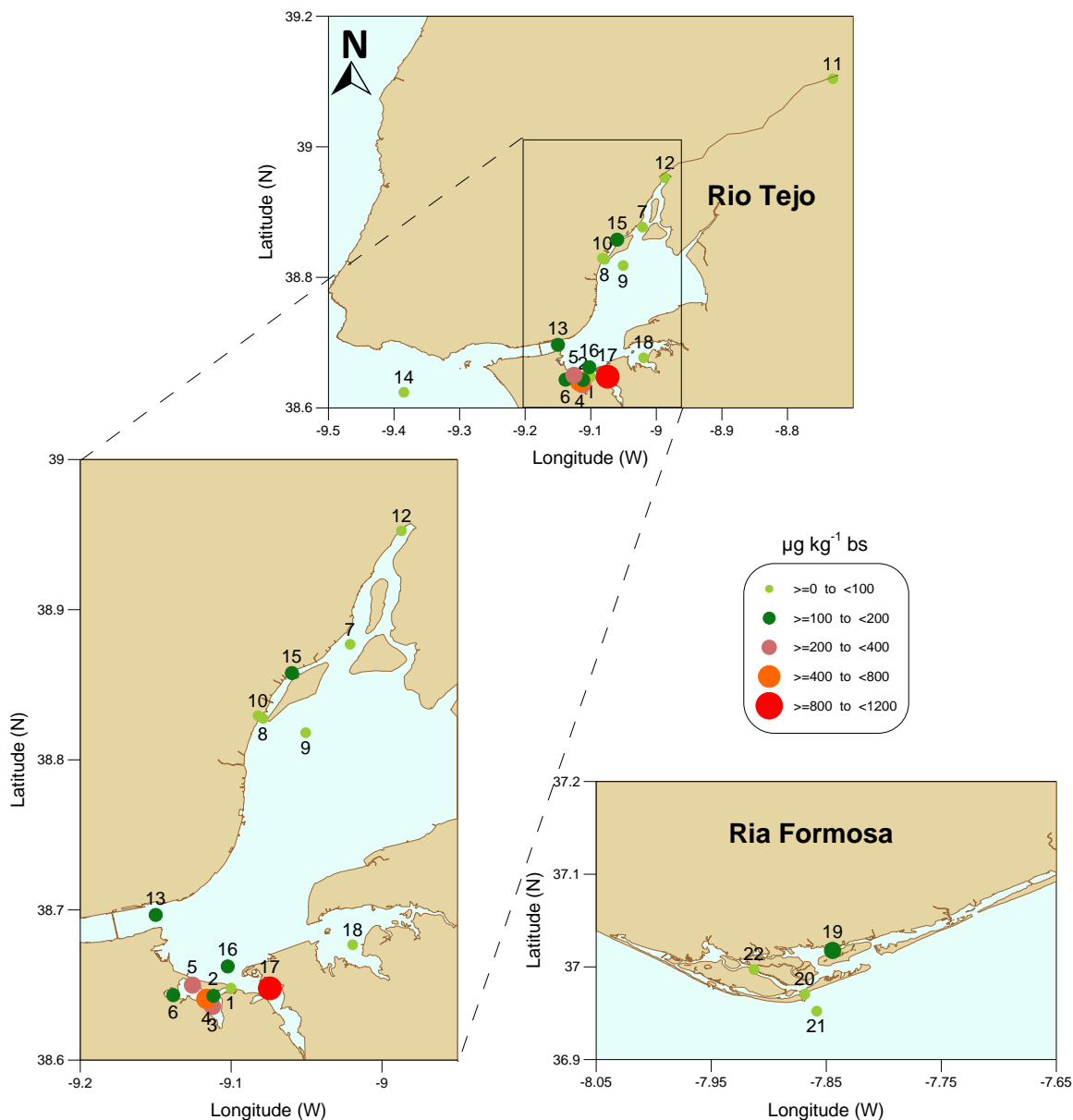


Fig. 19 - Distribuição espacial dos factores equivalentes de benzo(a)pireno (EBaP) em sedimentos.

Os Factores Equivalentes de Benzo(a)pireno (EBaP) na maioria das estações são inferiores a  $200 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ bs}$ , sendo excepções as estações 3, 4, 5 e 17.

Os teores obtidos para a Ria Formosa ( $< 200 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ bs}$ ) são comparáveis e da mesma ordem de grandeza dos valores obtidos para *Bell Point* (offshore) em *St. Marys River* (Hussain *et al.*, 1998). Estes autores classificaram estes valores como risco superior ao negligenciável de acordo com US EPA (1992) exclusivamente para a exposição cutânea.

Considera-se uma faixa de risco negligenciável quando é identificado um caso de cancro numa população de um milhão de indivíduos expostos.

De acordo com os mesmos autores só são consideradas duas classes de risco: risco negligenciável e risco superior ao negligenciável.

Relativamente aos teores obtidos para as estações 3, 4 e 5, situadas na baía do Seixal, estes são comparáveis e da mesma ordem de grandeza dos valores obtidos para Humber Bay (inshore). De acordo com os mesmos autores, estas amostras também têm um risco superior ao negligenciável. Já para a estação 17 (esteiro de Coia), apesar de apresentar teores de EBaP elevados, estes são cerca de três vezes inferiores aos encontrados para o canal *Lake George (offshore)* por Hussain *et al.* (1998).

### 3.3.3 Quocientes Médios de Risco para o Sedimento

No que se refere à avaliação do risco potencial para o ecossistema são definidos os Quocientes Médios de Risco (RQs), que são determinados tendo em conta dois conjuntos de guias de qualidade ( $C_{QVs}$ ) que representam concentrações negligenciáveis (NCs) e concentrações máximas permitidas (MPCs) (Liu *et al.*, 2010). Os  $RQ_{sNC}$  e os  $RQ_{sMPC}$  são determinados pelos quocientes entre a concentração do PAH e o respectivo  $C_{QV(NC)}$  e  $C_{QV(MPC)}$ , respectivamente. O risco potencial para o ecossistema é estabelecido a partir de três classificações (risco negligenciável, risco moderado e risco severo) definidas tendo em conta os intervalos atribuídos a  $RQ_{NC}$  e  $RQ_{MPC}$ .

Contudo, estas abordagens permitem avaliar apenas o risco potencial para os ecossistemas de modo individual ou para um grupo específico de contaminantes.

Na figura 22 apresentam-se os valores obtidos para os Quocientes Médios de Risco do somatório dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA:

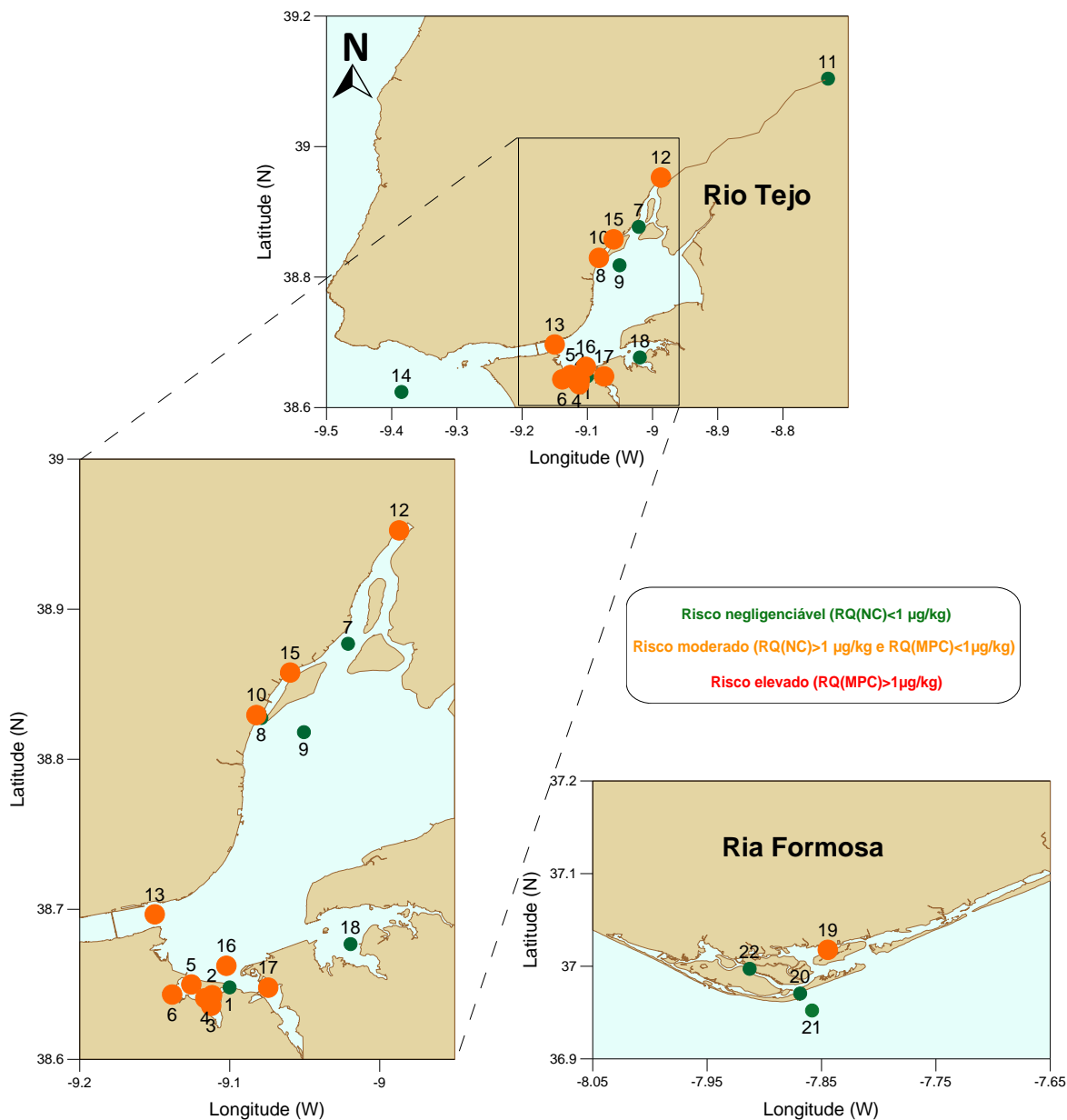


Fig. 20 - Distribuição espacial dos Quocientes Médios de Risco do somário dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA.

De acordo com o cálculo para RQs verifica-se através da figura 20 que o risco potencial para o ecossistema para as estações do Estuário do rio Tejo se classificam como risco moderado, sendo excepção as estações situadas a montante e a jusante deste (11 e 14, respectivamente) e as estações 1, 7, 9 e 18 que se classificam como risco moderado.

Em relação à Ria Formosa todas as amostras apresentam risco negligenciável à excepção da estação situada no cais comercial do canal de Olhão (19), cujo risco é moderado.

### 3.3.4 Guias de Qualidade para o Sedimento

Nas abordagens efectuadas anteriormente foram apresentados os riscos potenciais para o ecossistema de um modo individual ou para uma classe concreta de contaminantes. Tendo em conta que os sedimentos são um reservatório de múltiplos contaminantes, a toxicidade individual pode ser distinta da toxicidade combinada (Long & MacDonald, 1998; MacDonald *et al.*, 2000; Casado-Martínez *et al.* 2006; Liu *et al.*, 2009). Neste sentido, além da toxicidade individual dos PAHs deve ainda ser abordada a toxicidade tendo em conta outros compostos presentes, como por exemplo metais pesados (As, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb e Zn) e outros compostos orgânicos.

Foram deste modo, desenvolvidos quocientes médios de risco (mERMq e mPELq) como ferramenta adicional para a avaliação da toxicidade combinada com o intuito de criar prioridades de intervenção. Estes quocientes são dados pelas expressões:

$$mERMq = \frac{\sum \left( \frac{C_i}{ERM_i} \right)}{n} \quad mPELq = \frac{\sum \left( \frac{C_i}{PEL_i} \right)}{n}$$

em que,

**C<sub>i</sub>** - é a concentração individual do contaminante no sedimento;

**ERM<sub>i</sub>** ou **PEL<sub>i</sub>** - respetivo SQG;

**n** - número de contaminantes considerados.

Os autores classificaram as áreas de amostragem em quatro classes para definir prioridades de acção (tabela XVIII). Para cada classe foi estabelecido um intervalo de mERMq, um intervalo mPELq e um número de ERM/PEL/TEL excedido, associado a uma probabilidade de toxicidade que foi estudada com testes de sobrevivência de anfípodas (Long & MacDonald, 1998):

**Tabela XVIII** - Prioridade de acção associada a uma probabilidade de toxicidade (Long & MacDonald, 1998).

Risco	Avaliação	Toxicidade
Alto	mERMq>1,5 mPELq>2,3	74-88%
Médio-Alto	0,51≤mERMq≤1,5 1,51≤mPELq≤2,3	46-53%
Médio-Baixo	0,11≤mERMq≤0,5 0,11≤mPELq≤1,5	24-32%
Baixo	mERMq <0,1 mPELq<0,1	9-12 %

Analisando somariamente os SQG excedidos para cada estação e tendo em conta que só foram considerados os teores em PAHs descritos por Long & Macdonald verificou-se (tabela XIX) o número de SQG excedidos em cada estação de amostragem comparados com as respectivas concentrações dos compostos de PAHs e sua classificação quando à probabilidade de acção (toxicidade individual). Na tabela AN1 do Anexo A encontra-se os valores tabelados de ERL/ERM, PEL/TEL de acordo com os mesmos autores.

É importante ressaltar o facto de que para o cálculo dos mERMq e mPELq ter sido considerado n=15 e n=9, respectivamente. Estes guias são estabelecidos para um número elevado de compostos e elementos, no entanto na análise efectuada só foram considerados os hidrocarbonetos, podendo desta forma as classificações obtidas estarem distorcidas e comprometidas as conclusões retiradas a partir destes guias.

Ao nível da comparação entre estes guias a classificação atribuída por um ou outro nem sempre é igual, devido aos valores guias de PEL/TEL serem inferiores aos definidos para o ERL/ERM.

**Tabela XIX** - Número de SQG excedidos em cada estação de amostragem comparados com as respectivas concentrações dos compostos de PAHs e sua classificação quando à probabilidade de acção.

Zona		ERL-ERM (n=15)			PEL-TEL (n=9)		
		Excedidos	Excedidos (%)	Classificação de Risco	Excedidos	Excedidos (%)	Classificação de Risco
Rio Tejo	Baía do Seixal	1	0	Baixo	0	—	Baixo
		2	0		2	22,2	Médio-baixo
		3	1	Médio-baixo	7	77,8	Médio-alto
		4	2		7	77,8	
		5	1		3	33,3	Médio-baixo
		6	0	Baixo	2	22,2	
	Estuário	7A	0		0	—	Baixo
		7B	0		0	—	
		8A	0		0	—	
		8B	0		0	—	
		9A	0		0	—	
		9B	0		0	—	
		10	0		0	—	
		11	0		0	—	
		12	0		0	—	
		13	0		0	—	
		14	0		0	—	
		15	0		3	33,3	Médio-baixo
		16	0		3	33,3	
		17	11	Alto	8	88,9	Médio-alto
		18	0	Baixo	0	—	Baixo
Ria Formosa		19	0	Baixo	0	—	Baixo
		20	0		0	—	
		21	0		0	—	
		22	0		0	—	

A generalidade das amostras do estuário classificam-se como baixo-risco sendo excepção os sedimentos situados em zonas mais confinadas (est. 3, 4 e 5, situadas na baía do Seixal, e a estação 17, no esteiro de Coina) que se classificam como médio baixo-risco e alto risco. Em relação à Ria Formosa esta classifica-se como baixo risco independentemente do guia utilizado.

Na toxicidade combinada calculou-se os quocientes médios os mERMq e mPELq. Aplicando estes quocientes verifica-se que para todas as estações, os sedimentos se classificam em relação aos PAHs como baixo risco com excepção da estação 17 que se classifica como médio baixo risco (mERMq = 0,12 e mPELq = 0,20). Apresenta-se na



figura 21 a avaliação da contaminação combinada de sedimentos através dos coeficientes médios de ERM para os PAHs.

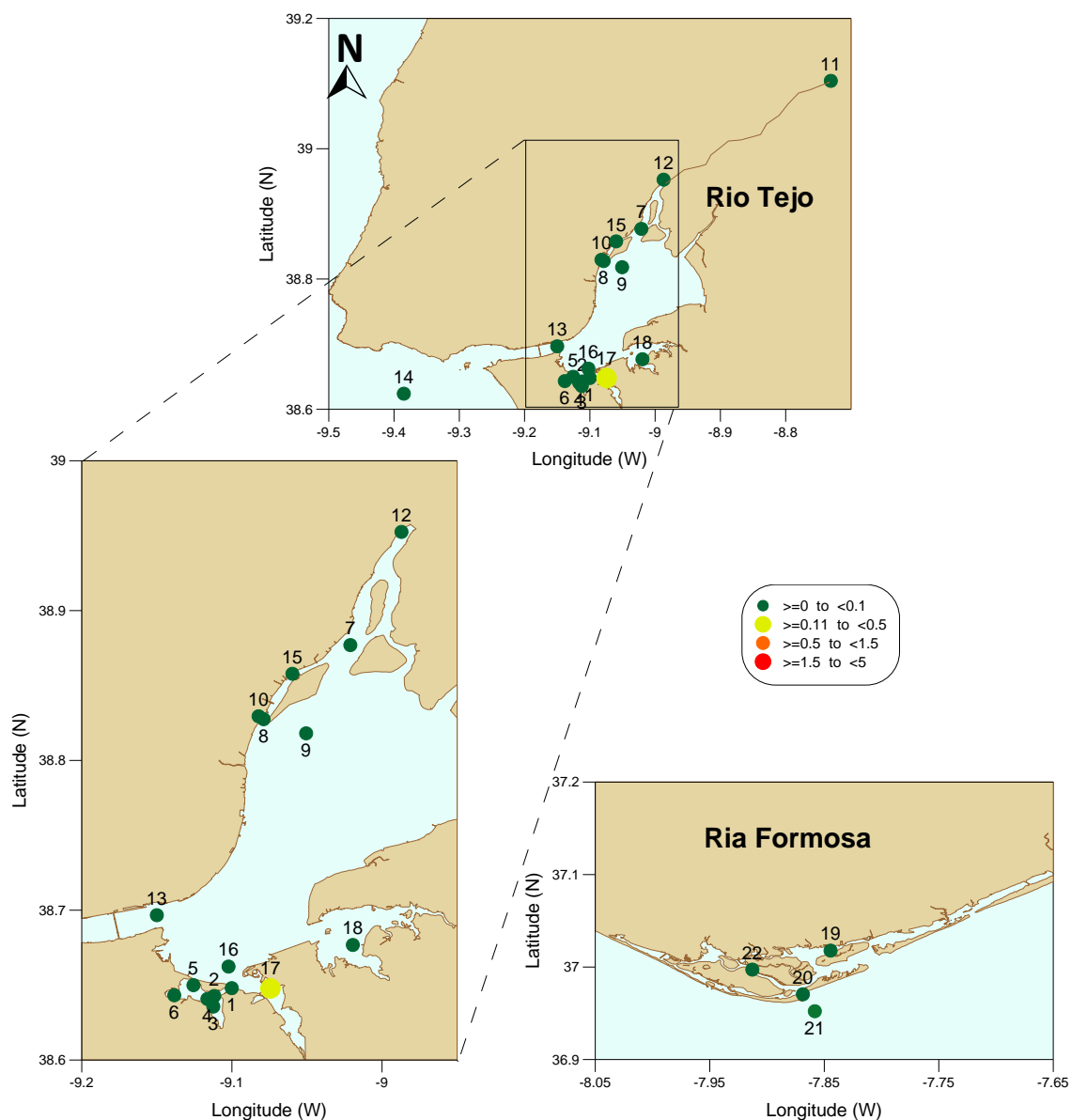


Fig. 21 - Avaliação da contaminação combinada em sedimentos através dos coeficientes médios de ERM para os PAHs.

### 3.4 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em *Spartina maritima* (16 PAHs da US EPA)

Para a *Spartina maritima* foram abordados e discutidos os resultados relativamente ao somatório dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA para a raiz e para a parte aérea.

Na tabela C1 do Apêndice C são apresentados os teores determinados para os PAHs em *Spartina maritima* para a raiz e para a parte aérea e na figura 22 estão representados os teores dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA.

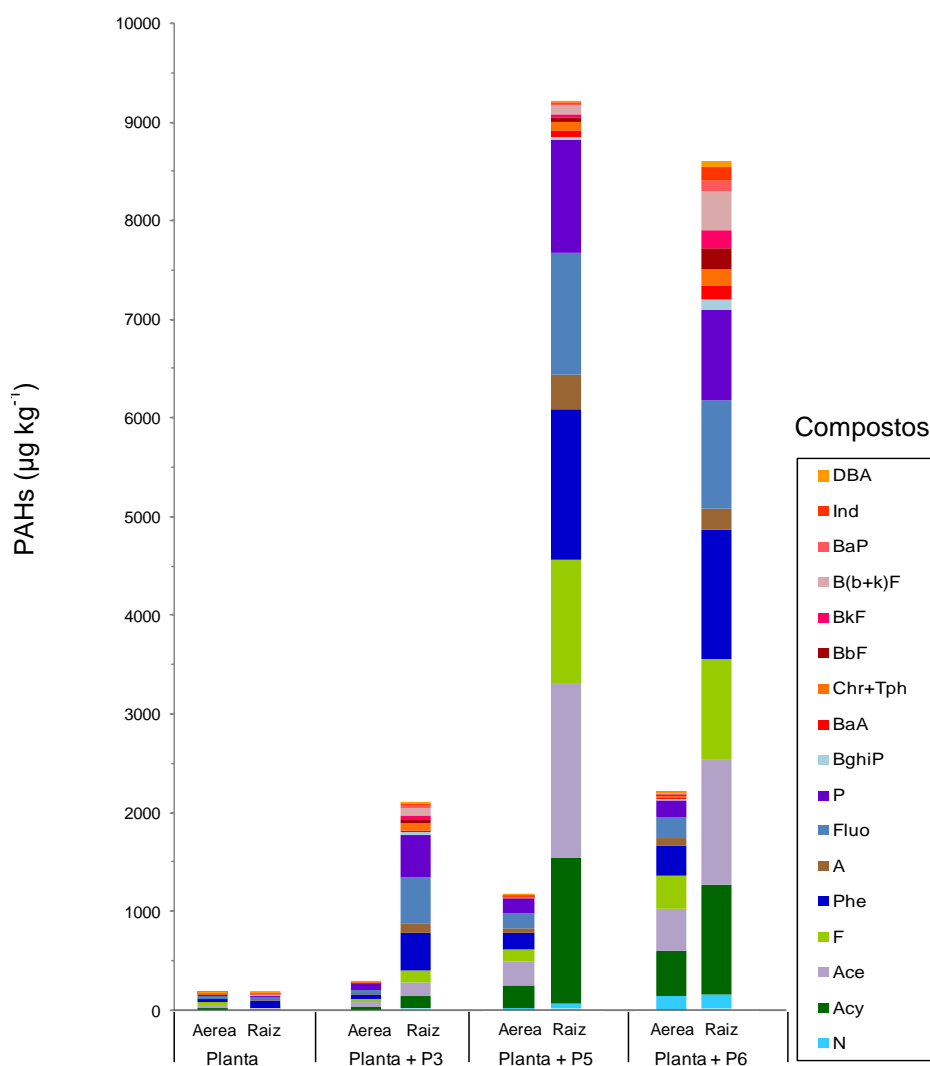


Fig. 22 - Concentração dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA para as amostras de *Spartina maritima*, em que os PAHs com potencial carcinogénico estão representadas em tons de rosa, laranja e vermelho.

De acordo com a figura 22 pode verificar-se que a planta *Spartina maritima* teve a capacidade de assimilar os compostos a que esteve exposta (16 PAHs da US EPA). Esta assimilação de PAHs já tinha sido demonstrada por Maillacheruvu & Safaai (2002) e Gao & Zhu (2004).

Comparando os valores obtidos para a raiz e para a parte aérea, os resultados evidenciam uma maior acumulação destes compostos na raiz à semelhança do que já teria sido referido para a *Spartina alterniflora* por Watts *et al.* (2006), como se verifica através da figura 23.

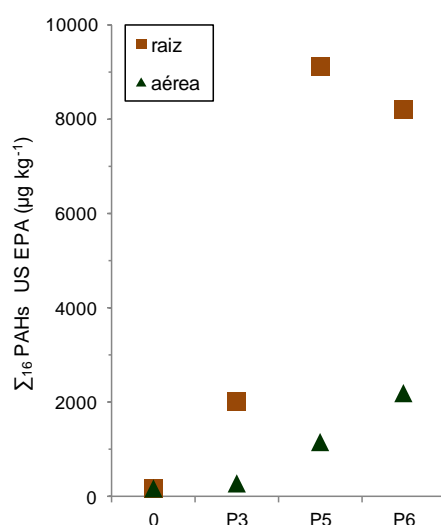


Fig. 23 - Concentração dos 16 PAHs considerados prioritários pela US EPA para as amostras de *Spartina maritima* para a raiz e parte aérea.

Para além disso, os teores do  $\sum_{16} \text{PAHs}$  obtidos na raiz são directamente proporcionais à concentração da solução a que foram expostas as plantas, à excepção da experiência para o P5. Este facto parece indicar a existência de um mecanismo protector, que permite a acumulação (bioacumulação) de compostos tóxicos ao nível da raiz e que impede a sua chegada à parte aérea desta planta.

Este fenómeno de bioacumulação nos organismos tem vindo a ser referida por diversos autores, entre os quais (Lyytikainen *et al.*, 2007; Morales-Caselles *et al.*, 2008; Hellou *et al.*, 2009).

No presente estudo e a nível da raiz este mecanismo parece atingir uma saturação no P5, uma vez que os teores do  $\sum_{16} \text{PAHs}$  P6 são cerca de 10% inferiores aos encontrados

no P5 (respectivamente 8194  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 9117  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Em relação à parte aérea verificou-se que não existe uma variação significativa entre a amostra nativa e a sujeita à solução P3. Entre o P3 e o P6 verificou-se a existência de uma correlação linear entre o  $\sum_{16}\text{PAHs}$  e as concentrações destas soluções.

Relativamente aos PAHs com potencial carcinogénico (tons de rosa, laranja e vermelho) esta tendência de acumulação na raiz ainda se torna mais evidente. Na totalidade das experiências, comparando apenas os resultados obtidos para as raízes, o somatório dos  $\sum\text{CPAHs}$  vai aumentando de forma directamente proporcional à concentração de CPAHs na solução em que estavam expostas (figura 24). Estes resultados parecem fortalecer a hipótese de um carácter de acumulação dos compostos mais perigosos para o ecossistema na raiz desta planta. No que concerne à parte aérea, verificou-se que as concentrações são semelhantes desde a planta no seu estado nativo até concentrações semelhantes à da solução P5, só com a exposição da concentração mais elevadas (P6) se verifica o aumento de 5 vezes o valor obtido para a planta sem qualquer exposição à solução de PAHs (figura 24).

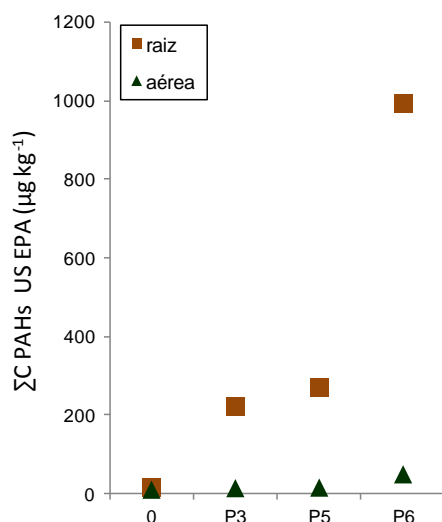


Fig. 24 - Concentração dos PAHs com potencial carcinogénico para as amostras de *Spartina maritima* na raiz e parte aérea.

Os PAHs de baixa massa molar são muito mais solúveis em água e voláteis que os PAHs de alta massa molar, os quais apresentam maior hidrofobicidade do que os compostos com baixa massa molar (Lunstedt, 2003; Khan *et al.*, 2008).

Apresenta-se na tabela XX os valores de LMW e HMW encontrados no presente estudo para a raiz e parte aérea da *Spartina maritima*.

**Tabela XX** - Concentração dos PAHs de LMW e HMW na raiz e parte aérea.

	$\mu\text{g kg}^{-1}$	Nativa	P3	P5	P6
Raiz	LMW	147	1856	8958	7395
	HMW	14	161	157	794
Aérea	LMW	164	263	1143	2156
	HMW	8,8	16	11	34

De acordo com a tabela XX verifica-se que tanto na raiz como na parte aérea os hidrocarbonetos de LMW são superiores aos HMW. É de notar que os valores de LMW e HMW nativos são da mesma ordem de grandeza e inferiores aos encontrados por Khan *et al.* (2008). Quando as plantas estão sujeitas às concentrações P3 e P5 verifica-se que os valores para a raiz para os HMW são cerca de 8 vezes superiores aos obtidos para a parte aérea. Esta evidência já tinha sido reportada anteriormente por Khan *et al.* (2008) em que ainda foi referido que a acumulação dos PAHs nas plantas ocorre sobretudo na raiz, esta acumulação torna-se ainda mais evidente para os HMW.

Em relação ao P6 esta razão entre os de baixa e alta densidade é de apenas 4 vezes superior, indicativo que existiu uma saturação por parte da raiz a estes compostos.

O naftaleno é um composto cuja toxicidade é 20 vezes superior à verificada para os PAHs de HMW devido à sua volatilização (Chaîneau *et al.*, 1997). Analisando os teores do naftaleno (tabela C1 do Apêndice C), constata-se que para a planta nativa estes valores são inferiores ao LQ ( $3,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Em relação ao P3 e P5 é de salientar os teores de N são superiores na raiz, o que poderá sinalizar uma função protectora da raiz a compostos de elevada toxicidade. Para o P6 estes valores são da mesma ordem de grandeza, o que poderá indicar que esta acumulação na raiz atingiu um ponto de saturação.

De acordo com Davis *et al.* (2002), embora as plantas tenham a capacidade de degradar ou sequestrar muitos compostos tóxicos, estas são sensíveis a muitos deles. A resposta ao *stress* por parte das plantas à presença de poluentes pode alterar a capacidade destas em controlar a assimilação (*uptake*) destes poluentes, aumentando o *uptake* e às vezes causando sérios problemas à própria viabilidade da planta. Contudo,

de acordo com os mesmos autores, estes efeitos dependem não só do próprio poluente, como da espécie da planta, da concentração e tempo de exposição a esse poluente.

## Capítulo IV: Conclusões e Trabalho Futuro

Tendo em consideração as diferentes abordagens efectuadas verificou-se que as amostras de sedimento recolhidas no rio Tejo apresentaram valores dos diversos PAHs superiores aos registados para as amostras da Ria Formosa, o que se justifica pela maior pressão antropogénica existente na região.

Tendo em consideração a inexistência de valores guias para sedimentos estuarinos foram utilizadas as classificações de acordo com a **Portaria 1450/2007 de 12 de Novembro** para uma análise indicativa. Verificou-se que a grande maioria dos sedimentos recolhidos no Estuário do rio Tejo e a totalidade dos sedimentos recolhidos na Ria Formosa pertencem à classe 1 e 2, classificadas como “material dragado limpo” e “material dragado com contaminação vestigiária”, respectivamente. As únicas estações que se classificaram como classe 3 – “material dragado ligeiramente contaminado” - foram registadas no Estuário do rio Tejo para a estação 4 (baía do Seixal) e 17 (esteiro de Coína).

Relativamente aos **PAHs considerados com potencial carcinogénico** (BaA, Chr, BbF, BkF, BaP, Ind e DBA), a grande maioria dos sedimentos recolhidos no Estuário do rio Tejo e a totalidade dos sedimentos recolhidos na Ria Formosa possuem uma totalidade de PAHs considerados cancerígenos até um valor de  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  bs. Os valores mais elevados, à semelhança do que se verificou para o somatório dos 16 PAHs da US EPA, foram registados nas estações 4 ( $1387 \mu\text{g kg}^{-1}$  bs) e 17 ( $2689 \mu\text{g kg}^{-1}$  bs), localizadas no Estuário do rio Tejo.

A análise dos **PAHs individuais** permitiu verificar que o composto com teores mais elevados, ou seja, em que o somatório das suas concentrações na totalidade das amostras foi mais elevado foi registado para o Fluoranteno (Fluo), em que o valor obtido foi igual a  $2824 \mu\text{g kg}^{-1}$  bs, seguido do Pireno (P), em que este valor foi de  $2265 \mu\text{g kg}^{-1}$  bs. Em oposição, foi verificado que o composto com teores mais baixos foi registado para o Acenafteno (Ace), em que o valor obtido foi igual a  $61 \mu\text{g kg}^{-1}$  bs.

Em relação à **origem dos PAHs** verificou-se que a razão LMW/HMW, para as estações 7B, 8A, 8B, 9A, 10, 11, 12, 15, 17 situadas no Estuário do rio Tejo e para a estação 20 na Ria Formosa, é superior a 1 o que indica que a origem destes hidrocarbonetos é petrogénica.

Para os **PAHs adicionais** o Per foi o PAH em que a concentração foi mais elevada, seguida do BeP. Este resultado é preocupante, uma vez que dos PAHs com potencial carcinogénico, isto é, em que foi demonstrada uma forte associação entre a sua administração e o desenvolvimento de um tipo de cancro específico, cancro que tem origem num tecido epitelial (carcinoma), o BaP é o mais fortemente associado a esta patologia.

No grupo dos **PAHs alquilados** e comparando as razões de C1-N e C2-N com C1-Phe e C2-Phe respectivamente, verificou-se que para a totalidade das amostras o grupo de Phe é o que tem os teores mais elevados, devido ao facto de o fenantreno ser termodinamicamente mais estável em relação ao naftaleno.

As estações 9A, 11, 20 e 21, e única e exclusivamente no que se refere aos teores em PAHs, registaram valores de condições naturais, pristinas porque não ultrapassam os os **Critérios de Avaliação de Background (BACs)** em nenhum dos hidrocarbonetos tabelados. Contudo, não se pode afirmar que estas estações têm sedimentos com estas características, uma vez que a análise efectuada a nível da toxicidade não teve em conta factores essenciais como a presença de outros poluentes como os metais pesados ou mesmo pesticidas.

Os teores dos **Factores Equivalentes do Benzo(a)pireno (EBaP)** para a maioria das estações são inferiores a  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  bs, sendo excepções as estações 3, 4, 5 e 17. Os teores obtidos para a Ria Formosa ( $<200 \mu\text{g kg}^{-1}$  bs) são comparáveis e da mesma ordem de grandeza dos valores obtidos para *Bell Point (offshore)* em *St. Marys River* (Hussain *et al.*, 1998). Estes autores classificaram estes valores como risco superior ao negligenciável de acordo com US EPA (1992) exclusivamente para a exposição cutânea.

Na análise do **risco potencial para o ecossistema - Quocientes Médios de Risco (RQs)** verificou-se que o risco potencial para o ecossistema para as estações do Estuário do rio Tejo se classificaram como risco moderado, sendo excepção as estações situadas a montante e a jusante deste 11 e 14 respectivamente e as estações 1, 7, 9 e 18 que se classificam como risco moderado. Em relação à Ria Formosa todas as amostras apresentaram risco negligenciável à excepção da estação situada no cais comercial do canal de Olhão (19), cujo risco é moderado.

Na **toxicidade combinada** foram calculados os quocientes médios (mERMq e mPELq). Aplicando estes quocientes pode afirmar-se que todos os sedimentos se classificaram em relação aos PAHs como baixo risco com excepção dos sedimentos da



estação 17 que se classificaram como médio baixo risco ( $mERMq = 0,12$  e  $mPELq = 0,20$ ).

Em suma, em relação aos resultados dos sedimentos, a estação 17 foi a que apresentou valores mais elevados dos diversos PAHs em estudo. Dada a localização deste ponto de amostragem (esteiro de Coína), estes resultados parecem resultar sobretudo de acção antropogénica proveniente de descargas efectuadas no efluente.

**Em relação ao estudo da (bio)disponibilidade** verificou-se que a planta *Spartina maritima* teve a capacidade de assimilar os compostos a que esteve exposta (16 PAHs da US EPA). Esta assimilação de PAHs já tinha sido demonstrada anteriormente por Maillacheruvu & Safaai (2002) e Gao & Zhu (2004).

Comparando os valores obtidos para a raiz e para a parte aérea, os resultados evidenciam uma maior acumulação destes compostos na raiz à semelhança do que já teria sido referido para a *Spartina alterniflora* por Watts *et al.* (2006).

Relativamente aos PAHs com potencial carcinogénico esta tendência de acumulação na raiz ainda se torna mais evidente. Na totalidade das experiências, comparando apenas os resultados obtidos para as raízes, o somatório dos  $\Sigma CPAHs$  vai aumentando de forma directamente proporcional à concentração de CPAHs na solução em que estavam expostas. Estes resultados parecem fortalecer a hipótese de um carácter de acumulação dos compostos mais perigosos para o ecossistema na raiz desta planta.

Como trabalho futuro e de modo a que o método de determinação de PAHs seja validado, devem ser efectuadas mais rectas de calibração (até atingir um mínimo de 20), devem ser validados os valores estimados de LD e LQ com amostras verdadeiras ou se tal não for possível, com soluções de padrão (certificadas) e fazer corresponder o LQ à concentração do padrão mais baixo.

Os resultados *in vitro*, como o presente estudo, podem ajudar a prever o efeito de determinados poluentes como os PAHs nos estuários ou mesmo em águas marinhas, no entanto deverá ser tido em conta o facto destas experiências serem efectuadas em curtos períodos de tempo, ao contrário do que acontece na exposição natural dos

ecossistemas. Por outro lado, a presença e/ou determinada concentração de um ou vários PAHs nos sedimentos ou águas poderá ainda alterar a solubilidade e a disponibilidade de outros compostos que podem ser poluentes para as plantas ou mesmo animais.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo os PAHs parecem entrar de forma passiva através das membranas celulares da raiz da *Spartina maritima*. Esta acumulação verificada na raiz pode ainda facilitar a entrada de outros poluentes como os metais pesados.

Os resultados obtidos até à data levam a considerar a importância do desenvolvimento de métodos que permitam concomitantemente uma determinação eficiente e da concentração dos PAHs e da sua (bio)disponibilidade. Este desafio de tentar compreender o risco real destes compostos para os seres vivos torna-se ainda mais significativo no estudo dos PAHs com elevado potencial cancerígeno como o BaP.

## Bibliografia

Arias, A. H., Marcovecchio, J. E., Freije, R. H., Ponce-Velez, G., Botello, A. V., 2010. Sources analysis and equivalent toxicity assessment of PAHs impacted sediments in Bahia Blanca Estuary, Argentina. *Hidrobiológica*, 20:1, 41-56.

ASTM - American Society for Testing & Materials, 2008. D 4840-99(2004), Standard Guide for Sample Chain-of-Custody Procedures. Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.01, West Coshohocken, PA, USA.

AWWA - American Water Works Association (Editors), 1999. Water Quality & Treatment – A Handbook of Community Water Supplies, McGraw-Hill Handbooks, New York, 5<sup>th</sup> ed, ch.2.

Barrick, R. C. & Prah, R. G., 1987. Hydrocarbon geochemistry of the Puget Sound region – III. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *Estuar. Coastal Shelf Sci.* 25, 175-191.

Baumard, P., Budzinski, H., Michon, Q., Garrigues, P., Burgeot, T., Bellocq, J., 1998. Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from mussel and sediment records. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 47, 77-90.

Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq, J., 1998a. Concentration of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin* 30, 951-960.

Caçador, I., Tibério, S., Cabral, H. N., 2007. Species zonation in Corroios salt marsh in the Tagus estuary (Portugal) and its dynamics in the past fifty years. *Hydrobiologia* 587: 205-211.

Caeiro S., Costa M.H., Ramos T.B., Fernandes F., Silveira N., Coimbra A., Medeiros G. Medeiros, Painho M., 2005. Assessing heavy metal contamination in Sado Estuary sediment: An index analysis approach. *Ecological Indicators*. 5:151-169.

Casado-Martínez, M.C., Buceta, J., Belzunce, M.J., DelValls, T.A., 2006. Using sediment quality guidelines for dredged material management in commercial ports from Spain. *Environmental International*, 32, 388-396.

Chaîneau, C. H., Morel, J. L., Oudot, J., 1997. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ. Qual.* 26, 1478-1483.

Chen, G. & White, P.A., 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutation Research*. 567: 151-225.

Coelho, E., Ferreira, C., Almeida, C., 2008. Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons by SPME-GC-FID in environmental and tap waters. *J. Braz. Chem. Soc.* [online]. vol.19, n.6, pp. 1084-1097.

Cofino, W. & Wells, D., 1994. Design and evaluation of the Quasimeme inter-laboratory performance studies: a test case for robust statistics. *Marine Pollution Bulletin* 29 (4): 149–158.

Costa, P.M., Neuparth, T.S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, A., Costa, M.H., 2011. Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus in situ studies. *Environmental Research*. 111 (1): 25-36.

Costa, H., 2010. Relatório sobre a observação de aves no sapal de Corroios e na Ponta dos Corvos entre 2006 e 2009, incluindo dados pontuais recolhidos na zona ribeirinha entre a Amora e o Seixal. Cadernos de Ornitologia n.º1 (disponível em <http://sites.google.com/site/cadernosdeornitologia>).

Cruz, I., 2011. REL.TF.QP 16/11 – Monitorização da Qualidade das Águas e dos Sedimentos da CTRSU – Jan-Dez 2010. Lisboa: Instituto Hidrográfico, 105 pp.

Cruz, I. & Valença, M., 2012. REL.TF.QP 03/12 – Monitorização da Qualidade das Águas e dos Sedimentos da CTRSU – Jan-Dez 2011. Lisboa: Instituto Hidrográfico, 253 pp.

Daling, P. S. & Faksness, L., 2002. Improved and Standardized Methodology for Oil Spill Fingerprinting. *Environmental Forensics* 3:263-278.

Daskalou, V., Vreča, P., Muri, G., Stalikas, C., 2009. Recent Environmental Changes in the Shallow Lake Pamvotis (NW Greece): Evidence from Sedimentary Organic Matter, Hydrocarbons, and Stable Isotopes. *Arch Environ Contam Toxicol*. Vol. 57, 21–31.

Davis, L.C., Castro-Diaz, S., Zhang, Q., Erickson, L.E., 2002. Benefits of vegetation for soils with organic contaminants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21, 457-491.

Day, J.H., 1981. Estuarine ecology with particular reference to southern Africa. A.A. Balkema, Rotterdam: 411 pp.

Djomo, J.E., Garriges, P., Narbone, J.F., 1996. Uptake and depuration of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediment by the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Environmental Toxicological Chemistry*, v.15, p.1177-1181.

EN 12880:2000. Characterization of sludges - Determination of dry residue and water content. European Committee for Standardization. 9 pp.

European Commission, 1998. Council Directive 98/83/EC, Off. J. Eur. Commun, L330, 32.

Fernández-Tajes, J., Flórez, F., Pereira, S., Rábade, T., Laffon, B., Méndez, J., 2010. Use of three bivalve species for biomonitoring a polluted estuarine environment. *Environmental Monitoring and Assessment*. 177:289-300.

Gadd G. M., 1990. Accumulation of metals by microorganisms and algae. In: Rehm K. J., ed., *Biotechnology Handbook 6B Special Microbial Processes*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.

Gao, Y., Zhu, L., 2004. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere* 55, 1169–1178.

Guia RELACRE 13, 2000. Validação de métodos internos de ensaio em análise química. 56 pp.

Hellou, J., D. Johnston, K. Cheeseman, A. Gronlund, E. Desnoyers, J. Leonard, S. Robertson, 2009. Bioavailability and Bioaccumulation of Pah in Amphipods Exposed to Reference and Harbor Sediments. *Polycyclic Aromatic Compounds* 29:12-27.

Hussain, M., Rae, J., Gilman, A., Kauss, P., 1998. Lifetime Health Risk Assessment from Exposure of Recreational Users to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35, 527-531.

IARC, 2012. A review of human carcinogens: chemical agents and related occupations. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 100F, 111–144.

IARC, 2009. A Review of Human Carcinogens, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 100 F.

IARC, 2010. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 92: 35-121.

ISO 8 466-1:1990. Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function. International Organization for Standardization.

ISO 8 466-2:2001. Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 2: Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions. International Organization for Standardization.

ISO 5667-3:2003 Water quality – Sampling – Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples. International Organization for Standardization.

Li, X., Li, P., Lin, X., Zhang, C., Li, Q., Gong., Z., 2007. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *Journal of Hazardous Materials* 150, 21-26.

Liu, A., Lang, y., Xue, L., Liu, J., 2009. Ecological risk analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from Laizhou Bay. *Environmental Monitoring Assessment*, 159, 429-436.

Liu, X., Xu, M., Yang, Z., Sun, T., Cui, B., Wang, L., Wu, D., 2010. Sources and risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in Baiyangdian Lake, North China. *Journal of Environmental Science and Health Part A*. 45, 413-420.

Long, E.R, MacDonald, D.D., Smith, S.L., Calder, F.D., 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management*, 19, 81-87.

Long, E.R. & MacDonald, D.D., 1998. Recommended uses of empirically derived, sediment quality guidelines for marine and estuarine ecosystems. *Human and Ecological Risk Assessment*, 4, 1019–1039.

Louro, E.M., 1997. Desenvolvimento de metodologia analítica de extração com fluido supercrítico de hidrocarbonetos de petróleo bioacumulados por moluscos bivalves (mexilhões). Instituto de Química, UFRJ Tese (Mestrado), 135p.

Lunstedt, S., 2003. Analysis de PAHs and transformation products in contaminated soil and remedial processes. 56f. Tese (Doutoramento) – Faculty of Science and Technology, Department of Chemistry, Umea University, Sweden, 2003.

- Lyytikäinen, M., S. Pehkonen, J. Akkanen, M. Leppanen, J. V. K. Kukkonen, 2007. Bioaccumulation and biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons during sediment tests with oligochaetes (*Lumbriculus variegatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 2660-2666.
- MacDonald, D.D., Ingersoll, C.G., Berger, T.A., 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Environmental Contamination and Toxicology*, 39, 20-31.
- MacDonald, D.D., Carr, R.S., Calder, F.D., Long, E.R., Ingersoll, C.R., 1996. Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. *Ecotoxicology*, 5, 253-278.
- Mackay, D., Shiu, W. Y., Ma, K.C., 1992. Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals, Vol.II: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Polychlorinated Dioxins, and Dibenzofurans. Chelsea, Mi, USA, Lewis Publications.
- Magi, E., Bianco, R., Ianni, C., Di Carro, M., 2002. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the Adriatic Sea. *Environmental Pollution*. Vol. 119, 91–98.
- Maillacheruvu, K., Safaai, S., 2002. Naphthalene removal from aqueous systems by *Sagittarius* sp. *Journal of Environmental Health A* 37, 845–861.
- Manoli, E. & Samara, C., 1999. *Trends Anal. Chem.*, 18, 417.
- Martin, J. & Milliman, J. D., 1997. EROS 2000 (European River Ocean System). The western Mediterranean: an introduction. *Deep-Sea Research II* 44: 521–529.
- Mazeas, O., 2004. Evaluation de l'exposition des organismes aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans le milieu marin par le dosage des métabolites de HAP. Teses (Doutoramento), LPTC, Université Bordeaux I, Bordeaux, France, 261 p.
- Medeiros, P. M., Cego, M. C., Castelao, R. M., Del Rosso, C., Fillman, G., Zamboni, A. J., 2005. Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Environment International*. 31, 77– 87.
- Meyers, P. A., 2003. Applications of organic geochemistry to paleolimnological reconstructions: a summary of examples from the Laurentian Great Lakes. *Organic Geochemistry*. Vol. 34, 261–289
- Mil-Homens, M., Stevens, R.L., Cato, I., Abrantes, F., 2007. Regional geochemical baselines for Portuguese shelf sediments. *Environmental Pollution*. 148: 418-427.
- Modelo Operacional para o Estuário do Tejo, 2014. Disponível em [http://www.mohid.com/tejo-op/sit\\_ref.htm](http://www.mohid.com/tejo-op/sit_ref.htm)
- Morales-Caselles, C., Ramos, J., Riba, I., Delvals, T. A., 2008. Using the polychaete *Arenicola marina* to determine toxicity and bioaccumulation of PAHs bound to sediments. *Environmental Monitoring and Assessment* 142: 219-226.
- Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2004. Levels of PAHs in soil and vegetation samples from Tarragona County, Spain. *Environ. Pollut.* 132, 1–11.

Neff, J. M., 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment sources, fates and biological effects. Applied Science Publishers, Barking, Essex, England, 262p.

NP EN ISO/IEC - 17 025:2005. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.

Ohea, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. Mutation Research. 567: 109–149.

OSPAR Commission, 2009. Background Document on CEMP Assessment Criteria for QSR 2010, OSPAR Commission, 25 pp.

OSPAR Commission, 1995. JAMP Guidelines for monitoring contaminants in sediments. Technical Annex 5, OSPAR Commission, London.

OSPAR Commission, 2002. Monitoring Guidelines - Technical Annex 6, 16, OSPAR Commission.

OSPAR COMMISSION, 2011. JAMP Guidelines for Monitoring Contaminants in Sediments, Ref. Nº: 2002-16, 113 pp.

Page, D.S., Boehm, P.D., Douglas, G.S., Bence, A.E., 1995. Identification of Hydrocarbon Sources in the Benthic Sediments of Prince William Sound and the Gulf of Alaska Following the Exxon Valdez Oil Spill. In: Wells, Peter G., Butler, James N., and Hughes, Jane S., 1995. Exxon Valdez Oil Spill: Fate and Effects in Alaskan Waters. American Society for Testing and Materials, Philadelphia ASTM STP 1219, p41-83.

Page, D.S., Boehm, P.D., Douglas, G.S., Bence, E.A., Burns, W.A., Mankiewicz, P.J., 1996. The natural petroleum hydrocarbon background in subtidal sediments of Prince William Sound, Alaska, USA. Environmental Toxicology and Chemistry 15, 1266-1281.

PODRF - Plano de Ordenamento e Desenvolvimento da Ria Formosa, 1984. Comissão de Coordenação da Região do Algarve. Vol. 1 e 2

Qiao, M., Wang, C., Huang, S., Wang, D., Wang, Z., 2006. Composition, sources, and potential toxicological significance of PAHs in the surface sediments of the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. Environ. Int. 32, 28–33.

Ramírez, N., Cuadras, A., Rovira, E., Marcé, R. M., Borrull, F., 2011. Risk assessment related to atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in gas and particle phases near industrial sites. Environ Health Perspect. 119(8): 1110–1116.

Ré, P., 2000. Apontamentos de Biologia Marinha. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Readman, J. W., Fillmann, G., Tolosa, I., Bartocci, J., Villeneuve, J. P., Catinni, C., Mee, L.D., 2002. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. Marine Pollution Bulletin. Vol. 44, 48–62.

Rocha M., 2013. Apontamentos dados de apoio às aulas de Química do Meio Aquático. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Sanders, G., Jones, K. C., Hamilton-Taylor, J., Dörr, H., 1993. Concentrations and deposition fluxes of polynuclear aromatic hydrocarbons and heavy metals in the dated sediments of a rural English lake. *Environ. Toxic. Chem.* 12, 1567-1581.

Santos, F. J., Galceran, M. T., 2002. *Trends Anal. Chem.*, 21, 672.

Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Pereira, C., Cravo, A., Fonseca, V. F., França, S., 2013. Evaluation of sediment toxicity in different Portuguese estuaries: Ecological impact of metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 130, 30-41.

Silva, J., Borges, C., Palma, C., Gama, A., 2011. REL TF OC 5/11 - Observações Hidro-oceanográficas para Caracterização e Valorização da Baía do Seixal Janeiro 2009 - Dezembro 2010. Lisboa: Instituto Hidrográfico, 104 pp.

Savinov, V.M., Savinova, T.N., Matishov, G.G., Dahle, S., Næc, K., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorines (OCs) in bottom sediments of the Guba Pechenga, Barents Sea, Russia. *Sci. Total Environ.* 306, 39-56.

Soares, H. M. V. M., Boaventura, R. A., Machado, A. A. S. C., Esteves da Silva, J. C. G., 1999. *Environ. Pollut.* 105, 311.

Staal, Y.C., Hebels, D.G., Van Herwijnen, M.H., Gottschalk, R.W., Van Schooten, F.J., Van Delft, J.H., 2007. Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effects on gene expression but synergistic effects on DNA adduct formation. *Carcinogenesis*. 28: 2632-2640.

Talley, L. D., Pickard, G. L., Emery, W. J., Swift J. H., 2011. *Descriptive Physical Oceanography: An Introduction (Sixth Edition)*, Elsevier, Boston, 560 pp.

Tronczynski, J., Munschy, C., Héas-Moisán, K., Guiot, N., Truquet, I., 2005. Analyse de contaminants organiques (PCB, OCP, HAP) dans les sédiments marins. Éd Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin, 44 pp.

UNEP - United Nations Environment Programme, 2006. Mediterranean Action Plan. Methods for Sediment Sampling and Analysis. UNEP(DEC)/MED Wg.282/Inf.5/Rev.1, Athens.

United States Environment Protection Agency, 1996. US EPA Method 3630C, Revision 3: Silica Gel Clean-up, 15 pp.

United States Environment Protection Agency, 1996. US EPA Method 3610B, Revision 2: Alumina Clean-up, 9 pp.

United States Environment Protection Agency, 1996. US EPA Method 3660B, Revision 2: Sulfur Clean-up, 6 pp.

United States Environment Protection Agency, 2007. US EPA Method 3545A, Revision 1: Pressurized Fluid Extraction (PFE), 16 pp.



US EPA - United States Environmental Protection Agency, 2001. Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual. US EPA-823-B-01-002. US EPA, Office of Water, USA.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149.

Venkatesan, M. I., 1988. Occurrence and possible source of Perylene in marine sediments - a review. *Marine Chemistry* 25, 1-27.

VROM, 1994. Environmental Quality Objectives in the Netherlands: A Review of Environmental Quality Objectives and Their Policy Framework in the Netherlands.

WHO - World Health Organization, 2004. Guidelines for Drinking-water Quality, Vol. I – Recommendation, 3<sup>rd</sup> ed, Geneva.

Wang, Z., Fingas, M. F., 2003. Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin* 47, 423-452.

Wang, Z., Fingas, M., Shu, Y.Y., Sigouin, L., Landriault, M., Lambert, P., Turpin, R., Campagna, P., Mullin, J., 1999. Quantitative characterization of PAHs in burn residue and soot samples and differentiation of pyrogenic PAHs from petrogenic PAHs - the 1994 mobile burn study. *Environmental Science and Technology* 33, 3100-3109.

Watts, A. W., Ballesterio, T. P., Gardner, K. H., 2006. Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in salt marsh plants *Spartina alterniflora* grown in contaminated sediments. *Chemosphere* 62, 1253–1260.

Wentworth, C. K., 1922. A scale of grade and class terms for clastic sediments. *J. Geology* 30:377-392.

Wise, S. A., Hilpert, L. R., Rebbert, R. E., Sander, L. C., Schantz, M. M., Chesler, S. N., May, W. E., 1988. Standard reference materials for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Frezenius Z Anal Chem* 332:573-582.

Witt, G., 1995. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water and Sediment of the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 31, n. 4-12, 237-248.

Yang, G., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the South China Sea. *Environmental Pollution*. Vol. 108, 163-171.

Yunker, M. B., MacDonald, R. W., Vingarzan, R., Mitchell, R. H., Goyette, D., Sylvestre, S., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH sources and composition. *Organic Geochemistry* 33, 489-515.

Zeng, E. Y., Vista, C. L., 1997. Organic pollutants in the coastal environment Off San Diego, California. 1. Source identification and assessment by compositional indices of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 179-188.

Zhang, L., Shi, K., Yue, L., 2007. Chemical characteristics and pollution sources of petroleum hydrocarbons and PAHs in sediments from the Beiluohe River, Northern China. *Environ Geol*. DOI 10.1007/s00254-007-

0645-6.

Khan, S., Aijun, L., Zhang, S., Hu, Q., Zhu, Y., 2008. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in lettuce grown in the soils contaminated with long-term wastewater irrigation. Journal of Hazardous Materials 152, 506-515.

### **Legislação**

Decreto-Lei 565/76

Decreto-Lei n.º 3731/87

Decreto-Lei n.º 103/2010

Decreto-Lei n.º 306/2007

Directiva n.º 2000/60/CE

Lei n.º 58/2005

Portaria 1450/2007

## **APÊNDICES**



## APÊNDICE A

### Duplicados dos PAHs em Sedimento



**Tabela A1 - Duplicados dos PAHs em amostras de sedimento.**

Composto	Duplicados	
	X1	X2
N	4,75	4,15
	0,800	0,800
	0,800	1,34
	1,67	1,27
Acy	1,20	1,20
Ace	3,88	2,21
F	4,88	3,88
Phe	46,2	40,5
	1,67	1,67
	1,00	1,20
	1,07	1,00
	4,82	4,75
	0,800	0,800
A	10,8	10,9
	1,20	1,27
Fluo	150	134
	1,75	1,76
	5,21	5,35
	1,54	1,54
	14,3	14,1
	1,60	1,67
P	128	115
	2,02	2,07
	6,41	6,55
	1,60	1,47
	11,6	12,7
	1,80	1,80
BaA	69,1	65,4
	3,21	3,07
	6,69	6,29
	0,870	0,800
Chr+Tph	77,4	73,7
	1,07	1,00
	4,68	4,54
	0,870	0,870
	7,56	7,56
	1,34	1,20

Composto	Duplicados	
	X1	X2
BbF	76,6	75,3
	1,07	1,14
	4,94	4,68
	7,36	6,49
	1,40	1,27
BkF	78,2	68,0
	0,800	0,800
	2,94	2,61
	6,89	6,62
	0,940	0,800
BaP	84,8	74,6
	0,800	0,800
	4,61	4,34
	7,09	6,62
Ind	88,5	77,1
	0,870	0,800
	3,01	2,87
	6,62	5,89
DBA	19,1	16,7
	1,34	1,14
B(ghi)P	79,6	72,4
	1,00	0,930
	4,01	3,94
	6,42	5,49
1-MN	1,20	0,940
	1,94	1,20
	1,15	1,15
2,3,5-MN	0,860	1,15
	1,74	1,27
2-MPhe	0,910	0,910
	10,7	9,57
	1,21	1,21
3,6-MPhe	1,84	1,65
	11,2	10,2
	1,72	1,72
	1,78	1,78

Composto	Duplicados	
	X1	X2
BeP	64,0	57,3
	0,870	0,870
	3,34	3,27
	5,62	5,69
	1,00	0,870
Per	152	149
	7,59	7,59
	15,0	15,7
	76,4	69,4
	11,3	10,5
C1-N	7,13	4,56
	4,23	4,26
	1,98	3,30
	1,20	1,18
	3,20	2,92
C2-N	1,50	1,55
	14,3	8,55
	6,65	6,60
	1,82	1,94
	2,14	1,41
C3-N	5,22	5,30
	11,6	7,69
	6,04	5,79
	1,32	2,17
	0,980	0,970
C1-Phe	3,61	3,61
	1,03	1,04
	44,5	39,6
	6,81	6,74
	2,57	2,95
C2-Phe	1,78	1,74
	13,9	12,0
	1,65	1,59
	73,0	70,0
	24,3	24,3
	8,96	7,94
	6,15	5,83
	14,0	14,0
	4,79	6,22
	5,89	5,11

N\*: naftaleno; F\*: fluoreno; Phe\*: fenantreno; A\*: antraceno; Fluo\*: fluoranteno; P\*: pireno; BaA\*: benzo(a)antraceno; Chr+Tph\*: Criseno+Trifenileno; BbF\*: benzo(b)fluoranteno; BkF\*: benzo(k)fluoranteno; BaP\*: benzo(a)pireno; Ind\*: indeno(1,2,3-cd)pireno; DBA\*: dibenzo(a,h)antraceno; B(ghi)P\*: benzo(g,h,i)perileno; 1-MN\*: 1-metilnaftaleno; 2,3,5-MN\*: 2,3,5-trimetilnaftaleno; DBT\*: Dibenzotiofeno; 2-MPhe\*: 2-metilfenantreno; 3,6-MPhe\*: 3,6-Dimetilfenantreno; BeP\*: Benzo(e)pireno; Per\*: Perileno; C1-N\*: metilnaftalenos; C2-N\*: dimetilnaftalenos; C3-N\*: trimetilnaftalenos; C1-Phe\*: metilfenantrenos; C2-Phe\*: dimetilfenantrenos.





APÊNDICE B

Teores dos PAHs em Sedimento



**Tabela B1 - Teores dos PAHs em amostras de sedimento.**

	1	2	3	4	5	6	7A	7B	8A	8B	9A	9B	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
N*	<0,7	4,4	10	25	11	7,2	1,1	0,8	5,3	5,4	<0,7	7,7	7,7	<0,7	3,2	8,5	1,5	15	7,0	17	2,4	5,5	<0,7	1,1	<0,7
Acy*	<0,7	1,2	11	26	13	8,8	<0,7	<0,7	3,4	<0,7	<0,7	1,6	5,1	<0,7	4,8	1,2	<0,7	1,9	2,5	47	1,5	0,8	<0,7	<0,7	<0,7
Ace*	<0,7	3,0	2,6	11	2,3	2,1	<0,7	<0,7	3,0	1,8	<0,7	0,9	2,6	<0,7	1,6	4,6	<0,7	10	2,3	8,5	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7
F*	<0,7	4,4	6,7	22	4,6	6,1	<0,7	<0,7	3,3	2,3	<0,7	2,5	6,6	<0,7	4,6	5,0	<0,7	16	4,2	27	1,6	2,2	<0,7	<0,7	<0,7
Phe*	0,7	43	55	103	35	34	1,1	1,7	23	12	0,8	13	30	1,0	38	38	4,8	100	44	355	11	24	<0,7	1,2	<0,7
A*	<0,7	11	24	51	17	16	<0,7	<0,7	4,4	1,7	<0,7	3,1	7,1	<0,7	7,3	9,3	1,2	16	19	160	4,2	6,3	<0,7	<0,7	<0,7
Fluo*	3,2	142	152	389	129	126	5,3	1,8	15	10	1,6	29	86	1,5	81	93	14	181	148	1069	36	100	<0,7	4,7	3,8
P*	2,7	122	122	289	127	100	6,5	2,0	14	11	1,8	27	104	1,5	64	82	12	145	114	778	36	96	<0,7	4,3	4,5
BaA*	1,3	67	90	189	77	60	3,1	0,7	4,4	6,4	0,8	14	32	<0,7	35	46	6,5	68	76	517	21	56	<0,7	1,9	1,5
Chr+Tph*	1,9	76	105	208	93	69	4,6	1,0	6,8	10	1,3	17	60	0,9	36	54	7,6	85	84	463	24	61	<0,7	3,3	4,7
BbF*	1,9	76	118	240	124	77	4,8	1,1	6,4	5,5	1,3	17	63	<0,7	29	47	6,9	75	67	423	26	56	<0,7	1,6	1,0
BkF*	1,8	73	108	241	106	68	2,8	0,8	2,9	3,6	0,9	15	17	<0,7	30	47	6,8	63	67	389	24	54	<0,7	1,8	2,8
B(b+k)F*	3,7	145	222	474	224	147	7,8	2,0	8,7	9,3	2,2	33	74	1,2	58	93	14	139	133	801	49	111	<0,7	5,1	5,5
BaP*	1,5	80	112	218	107	69	4,5	0,8	3,2	5,8	0,7	17	28	<0,7	34	53	6,9	71	77	477	26	67	<0,7	2,4	1,9
Ind*	1,5	83	125	249	121	80	2,9	0,8	2,0	4,0	0,8	15	34	<0,7	26	42	6,3	61	65	350	24	56	<0,7	1,7	1,4
DBA*	<0,7	18	25	49	24	16	<0,7	<0,7	<0,7	1,3	<0,7	3,3	9,3	<0,7	5,5	8,4	1,2	13	13	81	5,2	10	<0,7	<0,7	<0,7
B(ghi)P*	1,7	76	108	209	106	71	4,0	1,0	2,8	5,7	1,1	18	55	<0,7	26	38	6,0	56	57	282	24	53	<0,7	3,0	2,7
1-MN*	<0,7	1,6	2,9	7,7	4,3	2,0	1,0	1,1	4,7	6,7	<0,7	3,8	6,3	<0,7	2,3	5,3	<0,7	10	4,4	5,9	1,2	6,2	<0,7	1,0	<0,7
2,3,5-MN*	<0,7	1,5	2,1	11	3,9	2,9	<0,7	0,9	0,8	6,5	<0,7	3,1	14	<0,7	2,3	4,1	<0,7	15	0,9	2,9	0,9	1,4	<0,7	<0,7	<0,7
Dbt*	1,1	1,3	7,2	17	6,1	7,3	<0,7	<0,7	3,2	2,7	<0,7	<0,7	7,4	<0,7	3,0	6,9	0,7	13	5,0	30	2,7	3,8	<0,7	0,8	<0,7
2-MPhe*	<0,7	10	12	21	8,3	7,8	<0,7	1,2	7,5	6,3	<0,7	4,9	102	<0,7	6,4	15	1,7	26	12	69	5,9	14	<0,7	1,3	<0,7
3,6-MPhe*	<0,7	11	11	53	8,3	14	<0,7	1,7	4,1	20	<0,7	4,5	52	<0,7	5,6	15	1,8	25	5,1	16	2,9	6,0	<0,7	1,4	<0,7
BeP*	1,6	61	90	181	89	59	3,3	0,9	5,0	5,8	0,9	16	49	<0,7	26	38	5,7	64	54	284	20	68	<0,7	3,4	4,4
Per*	5,4	151	237	711	196	217	15	7,6	13	42	11	309	298	0,7	207	324	73	952	132	422	286	46	<0,7	9,2	2,2
C1-N*	<0,7	5,8	13	35	19	9,2	2,6	4,2	15	26	1,5	15	28	1,2	9,1	21	3,1	43	12	25	5,4	21	<0,7	3,1	1,5
C2-N*	<0,7	11	20	55	25	16	1,9	6,6	7,0	27	<0,7	19	99	1,8	21	30	5,3	71	14	38	11	27	<0,7	3,1	1,0
C3-N*	<0,7	9,7	16	84	27	21	1,7	5,9	10	50	1,0	20	180	1,0	15	27	3,6	110	13	34	12	21	<0,7	1,4	<0,7
C1-Phe*	1,3	42	56	137	40	44	2,8	6,8	27	51	1,6	26	247	1,8	27	62	13	119	49	302	25	58	<0,7	4,5	1,8
C2-Phe*	2,6	72	200	874	139	192	8,4	24,4	56	334	5,5	72	783	6,0	43	96	14	271	122	439	80	157	5,5	22	9,4

N\*: naftaleno; Acy\*: acenaftileno; Ace\*: acenafteno; F\*: fluoreno; Phe\*: fenantreno; A\*: antraceno; Fluo\*: fluoranteno; P\*: pireno; BaA\*: benzo(a)antraceno; Chr+Tph\*: Criseno+Trifenileno; BbF\*: benzo(b)fluoranteno; BkF\*: benzo(k)fluoranteno; BaP\*: benzo(a)pireno; Ind\*: indeno(1,2,3-cd)pireno; DBA\*: dibenzo(a,h)antraceno; B(ghi)P\*: benzo(g,h,i)perileno; 1-MN\*: 1-metilnaftaleno; 2,3,5-MN\*: 2,3,5-trimetilnaftaleno; DBT\*: Dibenzo(tio)feneno; 2-MPhe\*: 2-metilfenantreno; 3,6-MPhe\*: 3,6-Dimetilfenantreno; BeP\*: Benzo(e)pireno; Per\*: Perileno; C1-N\*: metilnaftaleno; C2-N\*: dimetilnaftaleno; C3-N\*: trimetilnaftaleno; C1-Phe\*: metilfenantreno; C2-Phe\*: dimetilfenantreno.

## APÊNDICE C

Teores dos PAHs em *Spartina maritima*

**Tabela C1 - Teores dos PAHs nas amostras de *Spartina maritima*.**

	Raíz				Parte aérea			
	Controlo	P3	P5	P6	Controlo	P3	P5	P6
N*	<3,5	20	64	143	<3,5	<3,5	24	148
Acy*	<3,5	118	1471	1114	24	40	230	449
Ace*	<3,5	137	1771	1277	26	38	240	438
F*	6,0	115	1253	1011	21	26	127	324
Phe*	79	387	1527	1323	32	54	162	313
A*	20	90	340	209	8,1	6,6	51	68
Fluo*	16	467	1237	1091	23	43	154	216
P*	14	438	1152	927	23	48	146	174
BaA*	<3,5	20	51	141	<3,5	<3,5	<3,5	14
Chr+Tph*	4,7	66	90	161	<3,5	3,6	7,1	14
BbF*	<3,5	33	46	215	<3,5	<3,5	<3,5	8,9
BkF*	<3,5	48	43	186	<3,5	<3,5	<3,5	6,4
B(b+k)F*	<3,5	83	86	397	<3,5	<3,5	<3,5	12
BaP*	4,0	22	11	96	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5
Ind*	<3,5	26	27	141	<3,5	<3,5	<3,5	6,4
DBA*	<3,5	6,5	5,4	59	<3,5	3,80	<3,5	<3,5
B(ghi)P*	4,7	24	28	102	<3,5	6,6	4,2	12

N\*: naftaleno; Acy\*: acenaftileno; Ace\*: acenafteno; F\*: fluoreno; Phe\*: fenantreno; A\*: antraceno; Fluo\*: fluoranteno; P\*: pireno; BaA\*: benzo(a)antraceno; Chr+Tph\*: Criseno+Trifenileno; BbF\*: benzo(b)fluoranteno; BkF\*: benzo(k)fluoranteno; BaP\*: benzo(a)pireno; Ind\*: indeno(1,2,3-cd)pireno; DBA\*: dibenzo(a,h)antraceno; B(ghi)P\*: benzo(g,h,i)perileno.



## **ANEXOS**





## ANEXO A



**Tabela AN1** - ERL, ERM, PEL e TEL de acordo com Long *et al.* (1995) e MacDonald *et al.* (1996).

<b>Composto</b>	<b>ERL*</b>	<b>ERM*</b>	<b>PEL*</b>	<b>TEL*</b>
N	160	2100	34,6	391
Acy	44	640	—	—
Ace	16	500	—	—
F	19	540	—	—
Phe	240	1500	86,7	544
A	853	1100	46,9	245
Fluo	600	5100	113	1494
P	665	2600	153	1398
BaA	261	1600	74,8	693
Chr+Tph	384	2800	108	846
BaP	430	1600	—	—
DBA	63,4	260	—	—
ΣPAHs (16 US EPA)	4000	44792	655	6676
LMW	552	3160	—	—
HMW	1700	9600	—	—

ERL\* (*effects range - low*): que indica o limite de concentração abaixo do qual os sedimentos raramente são tóxicos;

ERM\* (*effects range - medium*): indica que os sedimentos provavelmente são tóxicos;

PEL\* (*Probable Effect Level*): que é o nível acima do qual é provável a ocorrência de efeito adverso à comunidade biológica;

TEL\* (*Threshold Effect Level*): que indica o nível abaixo do qual não ocorre efeito adverso à comunidade biológica.



## ANEXO B

**Poster apresentado nas 3<sup>as</sup> Jornadas de Engenharia Hidrográfica do IH**



## Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em Sedimentos Marinhos: Concentração e (Bio)disponibilidade (Estudo Preliminar)

C. Torre <sup>(1) (2)</sup>, A. Rocha <sup>(1)</sup>, M. Valença <sup>(1)</sup>, C. Borges <sup>(1)</sup>, I. Cruz <sup>(1)</sup>, I. Caçador <sup>(2)</sup>  
cheila.torre@hidrografico.pt

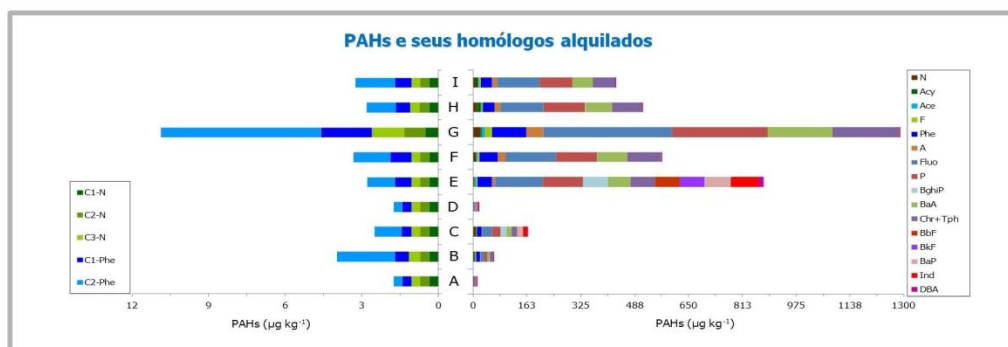
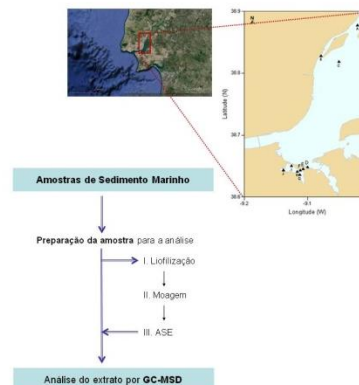
(1) Instituto Hidrográfico,  
(2) Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) são rotineiramente monitorizados no meio ambiente devido à sua persistência e, em particular, no ambiente marinho onde os seus efeitos são sentidos na flora e na fauna, com repercussões ao longo da cadeia trófica.

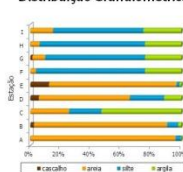
Os PAHs podem ser encontrados em plantas terrestres e aquáticas, solos, sedimentos, na água e na atmosfera, sendo 16 destes considerados como poluentes prioritários pela *United States Environmental Protection Agency* (US EPA). Recentemente, verificou-se a necessidade de incluir os homólogos alquilados dos PAHs nos planos de monitorização devido à sua persistência no meio marinho.

Para além da identificação e quantificação destes compostos é igualmente relevante avaliar a sua (bio)disponibilidade. Entende-se por biodisponibilidade (ou simplesmente disponibilidade) a quantidade de poluente presente no ambiente que pode ser tomada pelos organismos. A disponibilidade é função da mobilidade do poluente no sedimento e da sua especiação química, que é determinada por propriedades físico-químicas dos solos.

Neste estudo apresentam-se alguns resultados relativos à determinação de PAHs e seus homólogos em duas zonas do estuário do Tejo sujeitas a ação antropogénica. É ainda efetuada uma abordagem em termos dos teores de PAHs, em particular dos homólogos alquilados e dos PAHs cancerígenos.



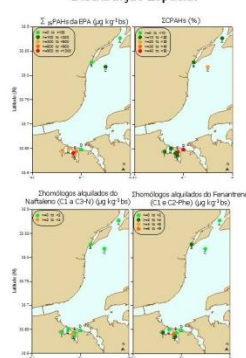
### Distribuição Granulométrica



### Grande variabilidade das partículas sedimentares:

- > Grupo 1 - entrada Baía do Seixal (est. D e E), em que a fração fina (<63 µm) varia entre 3,1 e 34,2%;
- > Grupo 2 - dentro da Baía do Seixal (est. G, H e I), a fração fina varia entre 84,9 e 96,2%;
- > Grupo 3 - margem norte, Mouchão da Póvoa (est. A, B e C), a fração fina varia entre 3,8- 74,3%.

### Distribuição Espacial



### Conclusões

- ✓ Os PAHs com concentrações mais elevadas são o Fluoranteno (Fluo), Pireno (P) e Benzo(a)antraceno (BaA) (este último com potencial cancerígeno);
- ✓ Soma dos 16 PAHs prioritários da US EPA ( $\Sigma 16\text{PAHs}$ ) mais elevada nas estações da Baía do Seixal (estações E, F, G e H);
- ✓ Na estação E e G o elevado valor encontrado para o  $\Sigma 16\text{PAHs}$  não está relacionado com a granulometria da amostra, o que leva a considerar a existência de uma elevada contribuição antropogénica;
- ✓ As estações G e H (situadas na margem mais a montante da Baía do Seixal) são muito idênticas sob o ponto de vista granulométrico, mas distintas a nível das concentrações de  $\Sigma 16\text{PAHs}$ ;
- ✓ Os teores mais elevados em homólogos alquilados foram obtidos para a estação G, sobretudo para o grupo de Dimetilfenantrenos (C2-Phe);
- ✓ 45% do teor em PAHs determinados para a estação E (entrada da Baía do Seixal) têm potencial cancerígeno ( $\Sigma \text{CPAHs}$ );
- ✓ A Baía do Seixal é a zona que apresenta valores mais elevados, do  $\Sigma 16\text{PAHs}$  e do  $\Sigma$ homólogos alquilados do Naftaleno (C1 a C3-N) e do Fenantreno (C1 e C2-Phe), provavelmente devido a fatores antropogénicos.
- ✓ Parece existir uma forte interdependência entre as concentrações dos PAHs e as ações antropogénicas, nomeadamente a existência de indústrias, atividades de navegação, e descarga de efluentes, entre outras.

### Referências

- ✓ EPA (1999) *Single Sol Clean-up Method 3530C*- Revision 3, United States: Environmental Protection Agency, 15p.
- ✓ Netto, A.D., Moser, J.C., Dias, A., Artilha, G., I. F. V. Ferreira, A. S. Oliveira, J. Baret, (2000) *Quim Nova* 23(8): 765-773.
- ✓ Nizzetto, L., Rohmann, L., Gola, R., Jahrike, Temme, A.C., Dachs, J., Herckes, P., Di Guardo, A., Jones, K. (2008) *Environmental Science Technology* 42, 1688-1695.
- ✓ OSPAR (2002) *Commission - OSPAR Guidelines for the Management of Dredged Material*, London.